

УДК 576.8.097.5.547.495.2

З. В. МАРШАВИНА, Е. Н. МАКАРОВА, А. Р. МХИТАРЯН

К ВОПРОСУ ОБ УСВОЕНИИ МОЧЕВИНЫ АУКСОТРОФНЫМИ МУТАНТАМИ

Изучалось отношение к мочеvine 4-х культур бактерий—продуцентов лизина: *M. glutamicus* шт. 95, 28, 8 и *Brevibacterium* шт. 22. Найдено, что ни один из штаммов *M. glutamicus* не усваивает мочеvinу как единственный источник азота, *Brevibacterium* оказался мочеvinоусваивающим штаммом, обладающим высокой уреазной активностью, тогда как у всех штаммов *M. glutamicus* последняя не обнаружена.

Мочевина как источник азота используется большинством микроорганизмов. Чаще всего усвоение ее связано с наличием уреазы в клетках, активность которой зависит как от факторов внешней среды, так и от физиологического состояния культуры [2, 3, 5]. Отмечается стимулирование уреазной активности специфическим субстратом—мочеvinой, а также некоторыми аминокислотами, например аланином [7]. Представляет интерес неуреазный путь использования мочевины микроорганизмами, не имеющими уреазы [4, 6].

Имеются данные по определению уреазной активности и усвоению мочевины ауксотрофными мутантами, в частности *M. glutamicus*. Несмотря на слабую уреазную активность этой культуры [1], она хорошо усваивает мочеvinу, что обеспечивает высокий выход лизина [2, 3]. Однако следует отметить, что в этих работах либо использовался посевной материал, приготовленный из клеток, смытых с естественной агаризованной среды, либо синтетические ферментационные среды обогащались естественными субстратами (гидролизат казеина, кукурузный экстракт и др.), что в какой-то мере обеспечивало клетки доступным азотом и способствовало активированию определенных ферментных систем.

Цель нашей работы состояла в изучении усвоения мочевины как основного источника азота ауксотрофными мутантами в чистой синтетической среде с использованием микропосева культуры, исключающего какое-либо внесение дополнительных питательных веществ органической природы.

Материал и методика. Объектом исследования служили ауксотрофные мутанты-продуценты лизина: *M. glutamicus*, шт. 95, 8, 28 и *Brevibacterium*, шт. 22.

Опыты проводились в жидкой синтетической среде следующего состава (%): глюкоза—10; KH_2PO_4 —0,1; K_2HPO_4 —0,03; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,03; DL-треонин—0,1; DL-метионин—0,04; мел—2; биотин—2 мкг/100; тиамин—20 мкг/100. В качестве основных источников азота использовались сульфат аммония—2, мочеvinа—1, которые вносились на основе равенства азота. В опытах по использованию мочевины в качестве добавки к сульфату аммония, как основному источнику азота, она вносилась в концентрации 0,01 М. рН среды в течение всей ферментации поддерживался на уровне 7,2—7,5. Опыты проводились в больших пробирках с 5 мл среды в условиях интенсивной аэрации на качалке при 28°. Через каждые 24 часа брались пробы для определения прироста био-

массы методом нефелометрирования, потребления глюкозы—методом Хагедорн-Ненсена и синтезированного лизина—методом высоковольтного электрофореза в муравьино-уксуснокислом буфере, pH 3,1.

Посевной материал представлял собой суточную культуру с рыбного агара, который вносился в виде суспензии, содержащей 0,4—0,6 мг абсолютно сухого вещества биомассы в 5 мл среды.

Уреазная активность целых клеток определялась следующим образом. Культуры выращивались в вышеуказанной среде в течение 72 часов. Биомасса после центрифугирования несколько раз промывалась дистиллированной водой. После определения количества биомассы она была суспендирована (8 мг абс. сухого вещества/мл) в 25 мл фосфатного буфера, pH 6,5, с мочевиной (10 мг/мл). Инкубация клеточной суспензии длилась 18 час. на качалке. Пробы отбирались через 5 и 18 час., биомасса отцентрифугировалась, а надосадочная жидкость анализировалась на содержание аммиачного азота. В контрольном варианте, при отсутствии клеток, также определялся аммиачный азот методом несслеризации.

Об уреазной активности бесклеточных экстрактов судили по появлению аммиачного азота в инкубационной смеси, содержащей в 1 мл 25 мкмоль фосфатного буфера, pH 6,5, 50 мкмоль мочевины и 0,5 мл бесклеточного экстракта.

Получение бесклеточного экстракта проводилось следующим образом. Биомасса, тщательно отмытая от культуральной жидкости, разрушалась в стеклянном гомогенизаторе с безводным порошком Al_2O_3 и фосфатным буфером в течение 2—3 мин. После центрифугирования в течение 20 мин. при 4000X надосадочная жидкость представляла собой бесклеточный экстракт. В нем определялся общий азот методом микрокельдаля и умножался на коэффициент 6,25. Опыты проводились в пробирках с герметически закрытыми пробками на качалке в ультратермостате при 37° в течение 2 час. и прерывались добавлением 1 мл 15% трихлоруксусной кислоты. Выпавший осадок белка отцентрифугировался, в надосадочной жидкости определялся аммиачный азот. Уреазная активность выражалась в мг аммиачного азота, образованного за час в пересчете на 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. Усвоение мочевины как основного источника азота. Данные, представленные на рис. 1, 2, 3, показывают процесс

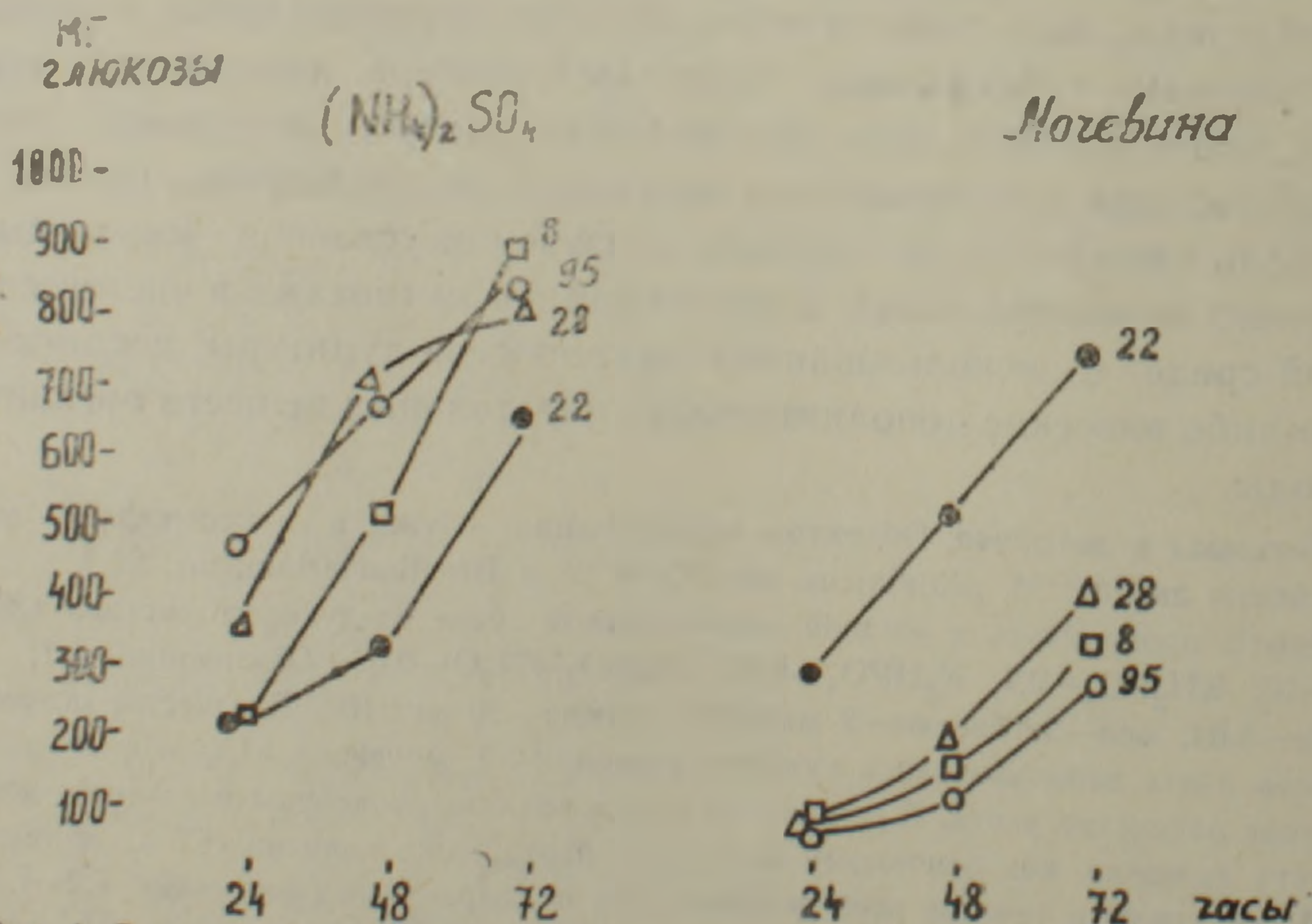


Рис. 1. Влияние источника азота на потребление глюкозы у *Micrococcus glutamicus*, шт. 95, 8, 28 и *Brevibacterium*, шт. 22.

мг
биомассы

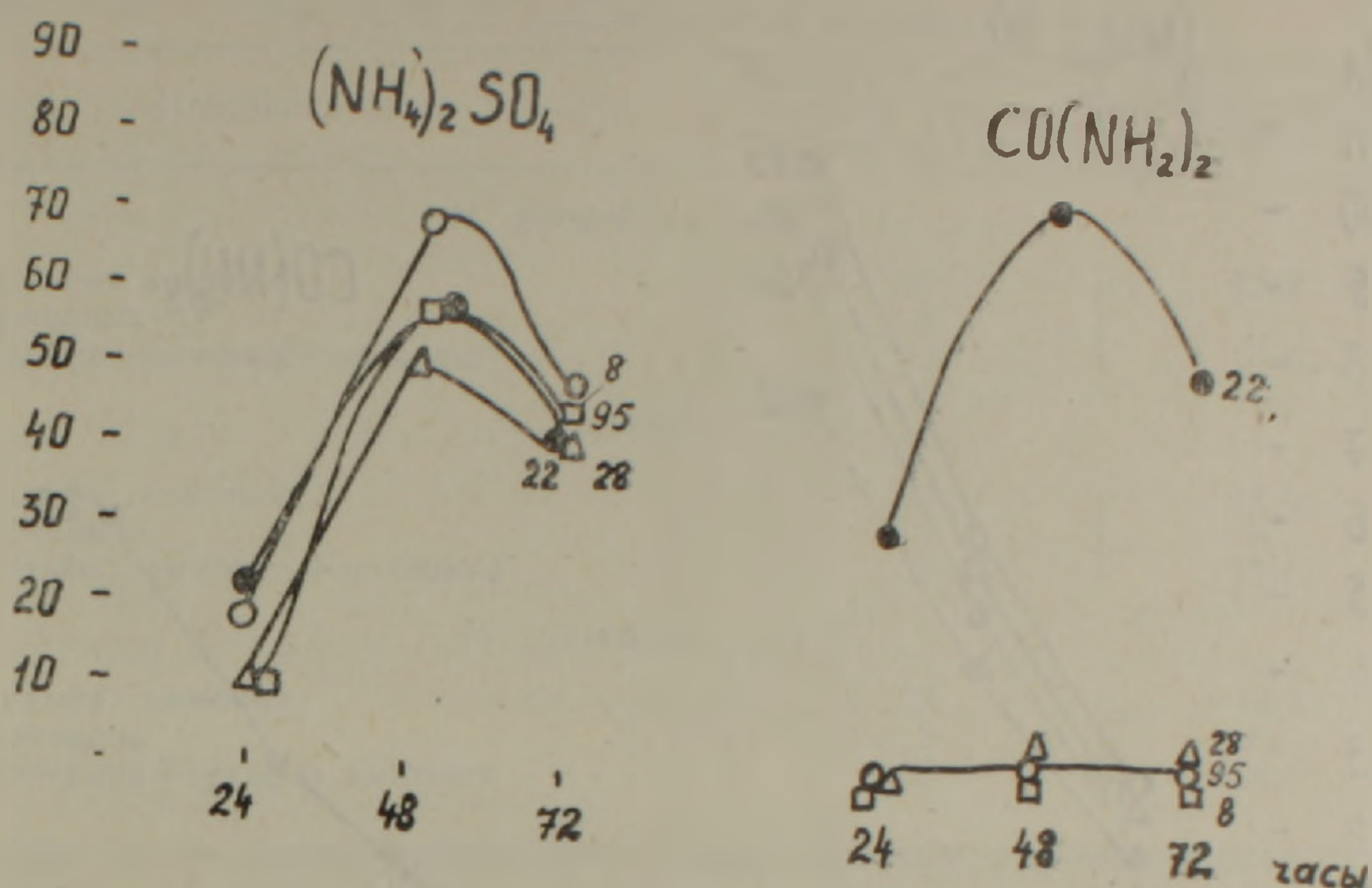


Рис. 2. Влияние источника азота на прирост биомассы у *Micrococcus glutamicus*, шт. 95, 8, 28 и *Brevibacterium*, шт. 22.

потребления глюкозы, прирост биомассы и биосинтез лизина у четырех культур при усвоении мочевины и сульфата аммония. В данных условиях опыта усвоение мочевины происходит только у одной культуры *Brevibacterium*, шт. 22. У этого штамма процессы потребления глюкозы (рис. 1) и прирост биомассы (рис. 2) протекают на более высоком уровне при усвоении этого источника азота, а не сульфата аммония. Однако лизин больше накапливается при усвоении сульфата аммония (рис. 3).

Таблица 1

Влияние концентрации мочевины на ее усвоение, данные на 72 час инкубации

Варианты	Потребленная глюкоза, мг/10 мл	Прирост биомассы, мг абс. сухого вещества на 10 мл	Синтезированный лизин, г/л
<i>Micrococcus glutamicus</i> , шт. 95			
Сульфат аммония	960	80,0	10,0
Мочевина 1 норма	250	4,0	0
Мочевина 3/4 нормы	250	4,0	0
Мочевина 2/4 нормы	100	0	0
Мочевина 1/4 нормы	0	0	0
<i>Brevibacterium</i> , шт. 22			
Сульфат аммония	700	72,0	14,7
Мочевина 1 норма	798	82,0	14,0
Мочевина 3/4 нормы	790	82,0	14,3
Мочевина 2/4 нормы	584	70,0	10,0
Мочевина 1/4 нормы	475	55,0	4,0

У всех мутантов *M. glutamicus* усвоения мочевины почти не происходит. Правда, потребление глюкозы достигает 30—40% исходного коли-

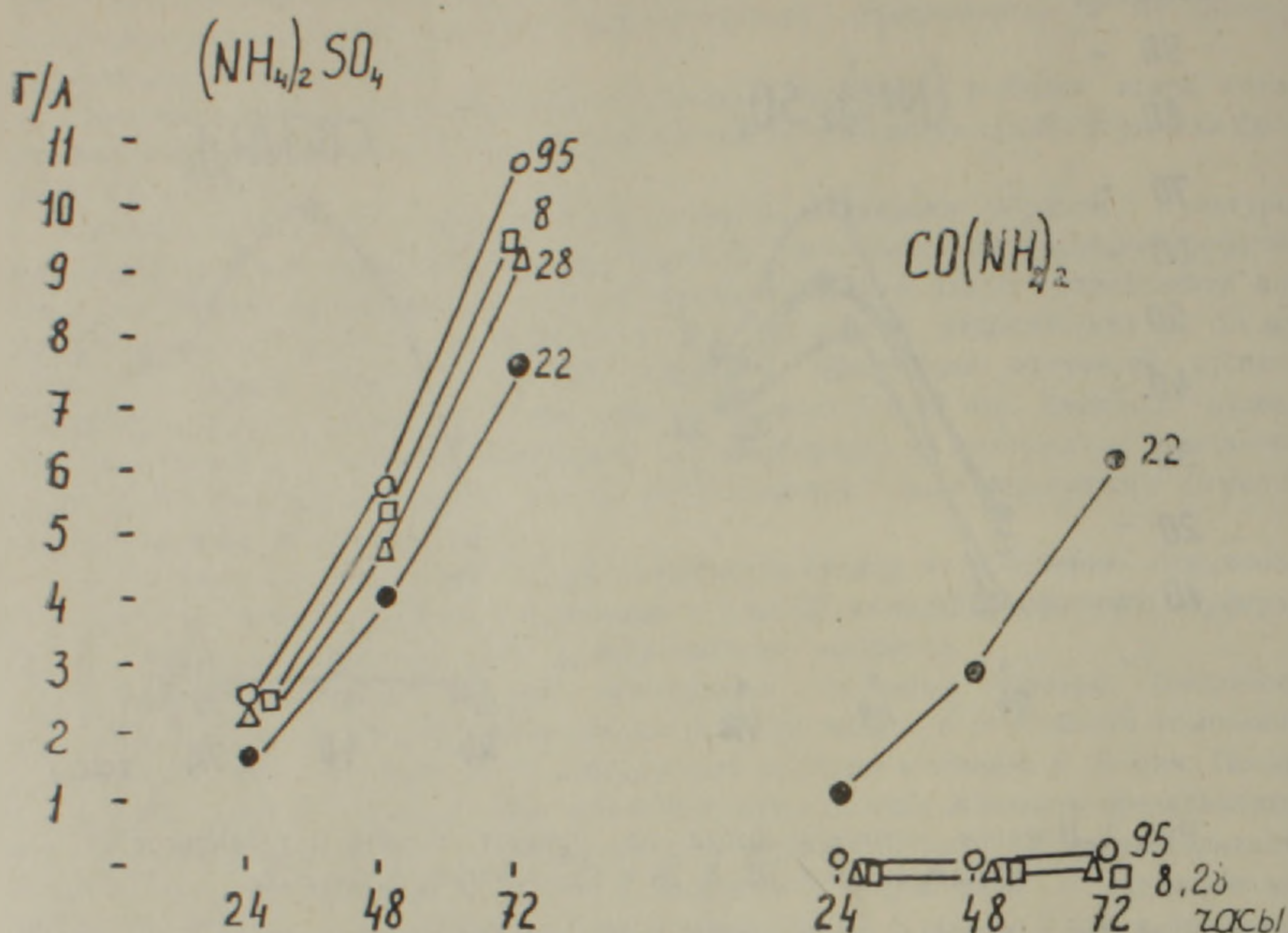


Рис 3. Влияние источника азота на биосинтез лизина у *Micrococcus glutamicus*, шт. 95, 8, 28 и *Brevibacterium*, шт. 22.

чества, но биомассы накапливается так мало, что она не обеспечивает синтез лизина. Только у одного штамма, 95, лизин обнаружен в виде следов.

Неусвояемость мочевины, как основного источника азота, *M. glutamicus* можно объяснить либо отсутствием активного фермента уреазы у этих штаммов, либо высокой концентрацией ее, которая может быть токсичной для культур. Для выяснения последнего предположения были поставлены опыты по изысканию оптимальной концентрации мочевины. Были испытаны 4 концентрации: полная норма, 3/4, 2/4 и 1/4 нормы. Данные этих опытов, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что концентрация мочевины не оказывает влияния на способность культуры усваивать данный источник азота.

Тем не менее оказалось, что для мочевиноусваивающего штамма *Brevibacterium* оптимальной концентрацией мочевины можно считать не полную норму, а 75% ее. Дальнейшее снижение концентрации мочевины в среде приводит к угнетению роста культуры и ее биосинтетических процессов.

Влияние сульфата аммония на усвоение мочевины. Для активирования ферментов при потреблении трудноусвояемого источника азота применяется метод прибавления к питательной среде легкоусвояемой формы азота в разных концентрациях. Так, нами была проведена серия опытов с заменой половины нормы мочевины сульфатом аммония. Данные приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние смеси сульфата аммония с мочевиной на жизнедеятельность *M. glutamicus*, шт. 95, 8, 28, данные на 72 час ферментации

Источники азота	Прирост биомассы, мг абс. сухого в-ва/10 мл	Синтезированный лизин, г/л
<i>M. glutamicus</i> , шт. 95		
Сульфат аммония	35	12,8
Мочевина	6	0
Сульфат аммония + мочевины	40	16,5
<i>M. glutamicus</i> , шт. 8		
Сульфат аммония	23	12,9
Мочевина	3	5
Сульфат аммония + мочевины	38	13,8
<i>M. glutamicus</i> , шт. 28		
Сульфат аммония	22	12,3
Мочевина	8	сл.
Мочевина + сульфат аммония	35	14,0

При такой замене наблюдается заметное стимулирование всех показателей жизнедеятельности клеток (по сравнению с контрольными вариантами). Если при усвоении сульфата аммония выход лизина у всех штаммов в среднем составляет 12,5 г/л, то в этом случае он увеличивается на 10—30% при незначительном увеличении прироста биомассы. Вероятно, при усвоении сульфата аммония из смеси с мочевиной поднимается общий ферментативный фон клеток *M. glutamicus*, в том числе активируется и уреазы, если этот фермент имеется в наборе клеточных ферментов.

Можно предположить также выработку в клетках адаптивной уреазы, так как в начале роста нужда в источнике азота будет удовлетворяться за счет сульфата аммония, а мочевины может транспортироваться в клетки и способствовать выработке адаптивной уреазы.

Роль мочевины в качестве добавки к сульфату аммония.

Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3

Действие мочевины в концентрации 0,01 М на фоне сульфата аммония как основного источника азота через 72 часа ферментации

Источники азота	Потребленная глюкоза, мг/10 мл	Прирост биомассы, мг абс. сухого в-ва/10 мл	Синтезированный лизин, г/л
Сульфат аммония	865	80	15,2
Сульфат аммония + мочевины	774	66	20,1
Сульфат аммония	603	62	13,7
Сульфат аммония + мочевины	572	60	15,8

Найдено, что мочевины в концентрации 0,01 М стимулирует процессы жизнедеятельности *M. glutamicus*, шт. 95 и *Brevibacterium*, шт. 22. Интересно, что она особенно интенсивно стимулирует жизнедеятельность

M. glutamicus, для которого не является основным источником азота. Возможно, что азот сульфата аммония обеспечивает все процессы, совершаемые в клетке при биосинтезе азотистых компонентов, а азот мочевины включается в какие-то специфические реакции, принимающие участие в процессе биосинтеза лизина, так как в данном случае именно этот процесс и стимулируется, а не прирост биомассы или потребление глюкозы.

В связи с полученными результатами представляет интерес изучение уреазной активности у ауксотрофных мутантов.

Уреазная активность целых клеток. Результаты, приведенные в табл. 4, говорят о том, что у *M. glutamicus*, шт. 95, уреазная активность выражена очень слабо. За 18 час. инкубирования этой культуры расщепленная мочевины составляет около 8% исходной, а образованный аммиачный азот достигает лишь 10,3 мг, что в 10 раз меньше, чем у *Brevibacterium*.

Таблица 4

Уреазная активность целых клеток в фосфатном буфере с мочевиной (фосфатный буфер, 0,15 М, рН 6,5—25 мл; биомассы—200 мг абс. сухого вещества, продолжительность инкубации 18 час.)

Культуры	Аммиачный азот, мг/25 мл			Уреазная активность/мг аммиачного азота, образуемого за 1 час 1 мг абс. сухого в-ва
	исх.	5 час	18 час	
<i>M. glutamicus</i> , шт. 95	0	4,6	10,3	$2,9 \cdot 10^{-3}$
<i>Brevibacterium</i> , шт. 22	0	25	110,5	$3,5 \cdot 10^{-2}$

Уреазная активность бесклеточного экстракта. При определении уреазной активности бесклеточных экстрактов (табл. 5) оказалось, что у *M. glutamicus* она полностью отсутствует, а у *Brevibacterium* проявляется довольно сильно.

Таблица 5

Уреазная активность бесклеточного экстракта ауксотрофных мутантов (инкубационная смесь 1 мл; 0,15 М фосфатный буфер, рН 6,5—25 мкмоль; мочевины—50 мкмоль; бесклеточный экстракт—0,5 мл; продолжительность инкубации—2 часа)

Культуры	Уреазная активность, мг аммиачного азота, образуемого за 1 час 1 мг белка (азот $\times 6,25$)
<i>M. glutamicus</i> шт. 22	0
<i>Brevibacterium</i> шт. 22	$8,5 \times 10^{-2}$

На основании сказанного можно сделать заключение о том, что *M. glutamicus*, шт. 95, 8, 28, не усваивает мочевины как основной источник азота, но в смеси с сульфатом аммония мочевины стимулирует все процессы жизнедеятельности культур. Низкая концентрация ее на фоне сульфата аммония — основного источника азота — также стимулирует все процессы жизнедеятельности. У *M. glutamicus* не обнаружено и активного фермента уреазы, тогда как у *Brevibacterium* этот фермент

очень активен, с чем связано интенсивное усвоение мочевины в качестве основного источника азота.

Институт микробиологии
АН АрмССР

Поступило 31.V 1974 г.

Զ. Վ. ՄԱՐԶԱՎԻՆԱ, Ե. Ն. ՄԱԿԱՐՈՎԱ, Ա. Ռ. ՄԽԻԹԱՐՅԱՆ

ՄԻՋԱՆՅՈՒԹԻ ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ՀԱՐՑԸ ԱՌԻՔՍՈՏՐՈՅ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հոդվածում բերված են տվյալներ միզանյութի յուրացման վերաբերյալ՝ որպես ազոտի հիմնական աղբյուրի, ինչպես նաև, որպես լրացուցիչ աղբյուր ամոնիումի սուլֆատի հետ, հոմոսերինի նկատմամբ աուքսոտրոֆ և լիզին արտադրող *M. glutamicus* շտ. 95, 28, 8 և *Brevibacterium* շտ. 22 մուտանտների կողմից:

Ապացուցված է, որ *M. glutamicus*-ի բոլոր շտամները, որպես հիմնական ազոտի աղբյուր, միզանյութ չեն օգտագործում, բայց ամոնիումի սուլֆատի հետ այն հանդիսանում է ստիմուլ այդ կուլտուրաների կենսագործնելիության բոլոր պրոցեսների համար:

M. glutamicus-ի մոտ չի հայտնաբերված ուրեազա ակտիվ ֆերմենտը, երբ *Brevibacterium*-ի մոտ ուրեազան շատ ակտիվ է, որի հետ էլ կապված է միզանյութի ինտենսիվ յուրացումը, որպես ազոտի հիմնական աղբյուրի:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Алиханян С. И., Дебабов В. Т., Езстюгов-Бабаев Л. М., Доданов В. Г., Зайцева З. М., Зубарев Т. Н., Легчилина С. И., Миндлин С. З., Тер-Саркисян Э. И. Технологический регламент производства С-лизина. М., 1967.
2. Зайцева З. М. Прикладная биохимия и микробиология, 2, 5, 519, 1966.
3. Маршавина З. В., Газарян В. Л., Аракелова В. А. Вопросы микробиологии. Физиология микроорганизмов, IV (XIV), 99, 1969.
4. Cook A., Boulter D. Phytochemistry, 3, 2, 313, 1964.
5. Kaltwasser H., Kramer J., Couger W. Arch. Microbiol. 81 (2):178, 1972.
6. Kleczkowski K. Post. Biochem. 17, 3, 463, 1971.
7. Mauso R., Maria Martinez. Rev. Patron Biol. anim. 15, 2, 147, 1971.