

ПОЛУЧЕНИЕ L-ЛИЗИНА С ПОМОЩЬЮ АЦИЛАЗ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

А. А. ХАЧАТУРЯН, Э. К. АФРИКЯН

Методом накопительных культур выделен углеводородокисляющий штамм микробактерии *Mycobacterium smegmatis*, способный гидролизовать эpsilon-бензоил-DL-лизин с образованием L-лизина. Оптимальной средой для образования эpsilon-бензоил-L-лизинацилазы и накопления максимального количества биомассы этой культурой является среда Чибаты с гексадеканом. Наибольшая активность штамма проявляется на пятые сутки роста при 30° в реакционной смеси с рН 7,2.

Оптическое разделение ацилпроизводных аминокислот с помощью микробных аминокислаз привлекает в последние годы большое внимание ученых и работников производств. С применением ацилаз грибного и бактериального происхождения осуществляется эффективное получение оптически активных форм многих аминокислот на основе получаемых химическим путем их рацематов [1].

Исключительно важные перспективы использования микробных аминокислаз для получения оптически активных аминокислот открываются на основе применения иммобилизованных клеток и ферментов. Значительные успехи в этой области достигнуты в Японии Чибатой с соотр. [2].

Ацилазы микробного происхождения имеют довольно высокую ферментативную активность. Это подтверждается сравнительными данными, полученными Чибатой и соотр. [3] по эpsilon-бензоил-L-лизинацилазной активности очищенных энзиматических препаратов из разных источников, согласно которым активность экстракта из почек крысы составляет 2,59 мкмоль/час на 1 мг белка, а экстракта из штамма EA *Achromobacter pestifer*—15.000.

Ацилазную активность спорообразующих бактерий, в том числе деацилирование рацематов лизина, изучали Кимура и Африкян [4], выявившие специфику отдельных видов в отношении этой ферментативной способности.

Специальный цикл работ посвящен изучению эpsilon-лизинацилазы как наиболее перспективной для энзиматического оптического гидролиза ацетил- и бензоилпроизводных рацемата лизина [5, 6]. Этими авторами было изучено более 100 штаммов бактерий, грибов и дрожжей разных родов и видов. Наивысшую ацилазную активность проявили из бактерий *Achromobacter pestifer*, штамм AE и *Pseudomonas* sp., а из грибов—*Aspergillus oryzae*. Предложены оптималь

ные среды для выращивания бактерий и грибов с целью получения максимальной активности ацилаз, гидролизующих эpsilon-бензоил-DL-лизин.

За последние годы работы в этом направлении начаты и у нас в стране. Рубан и Харцхаева [7] изучали оптимальные условия образования некоторыми штаммами *Mycobacterium* и *Pseudomonas* оптически направленного энзима, гидролизующего ацетил-DL-триптофан, а также активность полученных из них трех видов ферментативных препаратов в виде сырой биомассы, экстрактов из них и ацетоновых порошков.

Лидере с соавт. [8] изучали влияние различных источников углерода и азота, микроэлементов и продолжительности выращивания на рост культур из родов *Mycobacterium* и *Pseudomonas*, гидролизующих ацилпроизводные рацематов метионина, фенилаланина и других аминокислот.

Использование углеводов в качестве источников углеродного питания для выращивания продуцентов микробных аминокислаз ранее не практиковалось. Наши исследования показали перспективность этих работ [9, 10], поскольку получение микробных эpsilon-бензоил-L-лизинацилаз может иметь важное значение для организации химико-микробиологического производства L-лизина, а использование n-алканов удешевит этот процесс.

Цель данной работы заключалась в выделении культуры активного продуцента бензоил-L-лизинацилазы и выявлении оптимальных условий ее образования на средах с n-алканами.

Материал и методика. Ацилазная активность микроорганизмов изучалась по ранее описанной нами методике [4, 9]. Объектом исследований служили углеводород-окисляющие микроорганизмы, выделенные из разных почв Армении и других районов страны методом накопительной культуры. В работе был испытан 251 образец почвы. Для накопительных культур применялась питательная среда следующего состава (г/л водопроводной воды): K_2HPO_4 —7,0; KH_2PO_4 —3,0; $(NH_4)_2SO_4$ —1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,1; $NaCl$ —0,5.

В качестве единственного источника углерода к среде добавлялась смесь алифатических углеводов, содержащая гексан, гептан, гексадекан, гептадекан в разных количествах в конечной концентрации 1 об/‰.

При выделении аукокотрофных микроорганизмов в среду вносились гидролизат казеина и смесь витаминов группы В в ростовых концентрациях. Накопительная культура использовалась в основном с разведением образца почвы 1:50, с двукратным пассажем на качалке при 30° и последующим высевом на пептонный агар (ПА), содержащий (г/л): пептон—20,0; $NaCl$ —5,0; K_2HPO_4 —2,0; сахарозу—5,0; дрожжевой аутолизат—5 мл.

Объектами исследований служили 183 культуры неспорозных бактерий и микобактерий, активно окисляющих алифатические углеводороды. Видовая идентификация указанных штаммов проводилась на основании изучения комплекса морфо-физиологических особенностей по определителю Красильникова [14].

Активность эpsilon-бензоил-L-лизинацилазы определялась по количеству образовавшегося лизина в 1 мл реакционной смеси с последующим пересчетом в проценты от теоретически полного расщепления рацемата [7]. Реакционная смесь составлялась из расчета 10 мг/мл субстрата и 100 мг влажной биомассы.

Для дифференциации оптического типа эpsilon-бензоил-L-лизинацилазы применялась L-лизиндекарбоксилаза, полученная из *B. cadaveris* [12.]

Основой подбора оптимальной среды для образования эпсилон-бензоил-L-лизинацилазы была принята среда следующего состава (г/л водопроводной воды): K_2HPO_4 —7,0; KH_2PO_4 —3,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,1; $NaCl$ —0,5; $(NH_4)_2SO_4$ —8,0; глюкоза—10,0. К этой основе в разных вариантах добавлялась смесь микроэлементов (г/л): $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,0004; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,0004; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ —0,00004; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ —0,0002. Вносился дрожжевой автолизат (—0,2%), глюкоза заменялась эквивалентным количеством гексадекана, а сернокислый аммоний—пептоном, аналогично среде Чибаты. предложенной для получения бензоил-лизинацилаз и содержащей (г/л): K_2HPO_4 —2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —1,0; пептона—10,0; глюкозы—50,0.

Во всех средах pH доводился до 7,0—7,2. Опыты ставились в стационарных условиях и на качалке (200—220 об. мин) в колбах Эрленмейра емкостью 250 мл с 30 мл среды, при 30°. На 2-е и 5-е сутки определялись pH среды, накопленные биомассы (весовым методом и нефелометрически) и ее бензоил-лизинацилазная активность.

При выращивании микроорганизмов на основной среде реакция ее не изменялась. На других средах она подкислялась до pH 6,0, поэтому в ходе опыта приходилось нейтрализовать ее стерильным 40-процентным раствором едкого натрия.

Определение влияния pH реакционной смеси на эпсилон-бензоиллизинацилазную активность культур проводилось внесенным субстрата и биомассы в фосфатный буфер с разными значениями pH.

Результаты и обсуждение. Данные наших исследований выявили ацилазную активность у большинства выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов. Сводные результаты опытов, обобщенные в табл. 1, показывают, что ацилазная активность чаще обнаруживается у микобактерий, в особенности к ацилпроизводным метионина, лейцина и норлейцина. Из числа выделенных 63 штаммов микобактерий продуцентом эпсилон-бензоил-DL-лизинацилазы оказался 61% изученных культур. Важно подчеркнуть различия в деацилировании как у разных ацилпроизводных, так и аминокислотных остатков испытанных субстратов. Так, из 35-ти культур рода *Pseudomonas* ацетил-DL-лейцин деацилировали 3 штамма, а бензоилпроизводное рацемата этой аминокислоты—5 штаммов. Более четко выявляется это различие при анализе деацилирующей активности культур этого рода по отношению к ацилпроизводным метионина: ацетил-DL-метионин деацилировали 7 штаммов, тогда как бензоилпроизводные—17. Специфика ацилазной активности выделенных культур микроорганизмов проявляется и на ацилпроизводных других аминокислот. Среди изученных нами 183 штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов ацилазной активности не было отмечено по отношению к ацетил- и бензоил-L-гистидину, бензоил-DL-аспарагину и ацетил-DL-триптофану. Весьма слабо эта активность выявляется к бензоил-эпсилон-аминокапроновой кислоте.

Для дальнейших работ по деацилированию ацилпроизводных рацемата лизина был отобран штамм № 632, явившийся наиболее активным продуцентом этих ацилаз. Он был выделен из горно-луговой почвы субальпийской зоны горы Арагац. В результате исследования морфо-физиологических особенностей указанный штамм был идентифицирован как *Mycobacterium smegmatis*. Ниже приводится его характеристика.

Т а б л и ц а I

Распространение и спектр действия ацилаз разных групп микроорганизмов
(Инкубация на ПА при 30° в течение 48 час.)

Субстраты	Количество продуцентов ацилаз среди:					
	неспороно- сных бакте- рий		в том числе рода <i>Pseu- domonas</i>		микобактерий	
	число продуцен- тов из 55 штам- мов	%	число продуцен- тов из 35 штам- мов	%	число продуцен- тов из 103 штам- мов	%
Ацетил-дегидро-DL-аланин	13	23,6	2	5,7	20	19,4
Ацетил-DL-валин	20	36,4	5	14,3	70	68,0
Ацетил-L-гистидин	0	0	0	0	0	0
Бензоил-L-гистидин	0	0	0	0	0	0
Ацетил-эпсилон-аминокапроновая кис- лота	3	5,5	0	0	17	16,5
Бензоил-эпсилон-аминокапроновая кис- лота	2	3,6	0	0	3	2,9
Ацетил-DL-лейцин	20	36,4	3	8,6	61	59,2
Бензоил-DL-лейцин	23	41,8	5	14,3	65	63,1
Ацетил-DL-метионин	25	45,5	7	20,0	75	71,5
Бензоил-DL-метионин	23	41,8	17	48,6	69	67,0
Эпсилон-бензоил-DL-лизин	20	36,4	15	42,9	63	61,2
Ацетил-DL-порлейцин	16	29,1	5	14,3	50	48,5
Ацетил-DL-триптофан	0	0	0	0	0	0
Ацетил-DL-фенилаланин	12	21,8	2	5,7	22	21,4
Бензоил-L-аспарагин	0	0	0	0	0	0

В цикле развития клетки культуры обнаруживают явно выраженную гетероморфную картину. В суточной культуре выявляются палочковидные, тонкие, без активного движения, расположенные одиночно или попарно, в виде рогаток, клетки размером 1,1—1,3×4—9 мк. Со временем, на 2—3-и сутки, они укорачиваются, принимая неправильнококковидную форму. При высеве этих кокковидных форм на питательные среды они развиваются в палочковидные клетки, причем обнаруживается характерное для микобактерий ветвление. Клетки грамположительны, содержимое их гомогенное, в старых культурах—с зернистыми полярными включениями.

Культура микобактерии обнаруживает способность хорошо расти на многих питательных средах:

На пептонном агаре (ПА), мясопептонном агаре (МПА) и средах с органическим азотом рост обильный, кремовый, влажнооблестящий, растекающийся. В старой культуре—розоватый, слабооблестящий, слабморщинистый. На среде сусло+МПА (1:1) и ломтике картофеля—обильный, розовый, жирнооблестящий, гладкий.

Штамм активно образует каталазу, уреазу, пальмитазу, пептонирует молоко, восстанавливает нитраты, но не образует ацетилметилкарбинол. Желатин не разжижает, крахмал не гидролизует. Хорошо

ферментирует глюкозу, фруктозу, сахарозу, галактозу, трегалозу, глицерин, использует натриевые соли янтарной, молочной, винной, бензойной и салициловой кислот, но не растет на маннозе, манните, сорбите, щавелевой, фумаровой, лимонной, фталевой кислотах. Хорошо развивается на аммонийных солях неорганических кислот, нитратах и нитритах, а также на источниках органического азота. Рост его стимулируют аланин, аргинин, глутамин, тирозин; аспарагин, глицин, пролин и триптофан оказывают угнетающее действие.

Изучение спектра окисления углеводов различного строения показало, что штамм 632 усваивает декан, ундекан, додекан, тридекан, пентадекан, гексадекан, октадекан, нонадекан, а также жидкий парафин, дизельное топливо и керосин.

Выявлена способность этого штамма гидролизовать ацетил- и бензоилпроизводные аминокислот. Как явствует из данных табл. 2, помимо бензоил-DL-лизина он активно деацилирует ацилпроизводные метионина, лейцина, норлейцина и валина.

Таблица 2

Спектр ацилазной активности штамма 632 на пептонной воде с глюкозой
(Инкубация—48 час. при 30° на качалке)

Субстраты	Ацилазная активность	Субстраты	Ацилазная активность
Н-ацетил-		бензоил-	
—дегидро-DL-аланин	—	L-аспарагин	—
DL-лейцин	+	L-гистидин	—
DL-норлейцин	+	DL-метионин	—
DL-фенилаланин	—	DL-лейцин	+
DL-валин	+	DL-валин	—
DL-триптофан	—	DL-аминокапроновая кислота	—
DL-метионин	+++	DL-лизин	+++

Условные обозначения: плюсами обозначена разная степень ацилазной активности, минусами—отсутствие ее.

В целях подбора оптимальной среды для образования эpsilon-бензоил-DL-лизнацилазы штамм 632 инкубировался в различных средах.

Данные исследований, которые сведены в табл. 3, показывают, что *Muc. stegmatis* штамм 632 хорошо растет на всех испытаниях, потребляя в качестве источника углерода как глюкозу, так и гексадекан. Отмечается также интенсивное накопление биомассы и большая ацилазная активность в условиях лучшей аэрации при культивировании на качалке на пятые сутки роста. При использовании в качестве источника азота сернокислого аммония относительно высокая ацилазная активность отмечается в вариантах с добавлением микроэлементов и дрожжевого автолизата, а в отношении углерода—в вариантах с гексадеканом. Опыты показали благоприятное влияние органического

Ацилазная активность штамма 632 к эpsilon-бензоил-DL-лизину на разных питательных средах (Данные опытов на 5-е сутки инкубации)

Среды	Основные компоненты и добавки	Повторности	Выход биомассы, мг/мл	Глубинный рост		Выход биомассы, мг/мл	Стационарный рост	
				бензоил-L-лизинацилаза			бензоил-L-лизинацилаза	
				L-лизин, мг/мл	% от теоретического расщепления		L-лизин, мг/мл	% от теоретического расщепления
I	Глюкоза и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	3,15	1,8	36	2,37	0	0
		2	3,93	1,6	32	1,65	0	0
II	Среда I и микроэлементы	1	2,24	1,5	30	0,6	0	0
		2	3,24	1,7	34	1,75	0	0
III	Среда II и дрожжевой автолизат	1	5,5	2,8	56	1,9	0	0
		2	3,94	2,8	56	2,0	0	0
IV	Гексадекан и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	5,8	2,4	48	3,66	0	0
		2	5,35	2,8	56	3,0	0	0
V	Среда IV и микроэлементы, дрожжевой автолизат	1	9,27	2,5	50	3,79	0	0
		2	8,85	2,9	58	1,63	0	0
VI	Глюкоза и пептон	1	10,8	3,2	64	8,7	1,5	30
		2	11,3	3,5	70	9,2	1,2	24
VII	Гексадекан и пептон	1	13,0	3,0	60	9,0	1,2	24
		2	13,5	3,2	64	9,5	1,2	24

азота—пептона на образование биомассы и ацилазы. Вероятно, для повышенной активности этого фермента наличие органического азота в питательной среде является желательным. Гексадекан оказался в данном случае почти равноценным глюкозе. Кроме того, в процессе исследований мы обратили внимание на тот факт, что количество биомассы не во всех случаях коррелирует с ее ацилазной активностью. Из табл. 3 видно, что в вариантах IV и V, несмотря на большую разницу в накоплении биомассы, ацилазная активность культуры находится в одинаковых пределах. Очевидно, наличие дрожжевого автолизата в среде сыграло положительную роль в образовании эpsilon-бензоил-L-лизинацилазы.

В специальных опытах была изучена динамика ацилазной активности штамма 632 в процессе глубинного выращивания культуры продуцента на модифицированной среде Чибаты с использованием в качестве единственного источника углерода гексадекана. Данные опытов показали, что ацилазная активность является наиболее высокой на 4—5-е сутки, затем она снижается. Изучение влияния реакции среды обнаружило, что наиболее оптимальной pH реакционной смеси яв-

ляется рН 7.2. Ацилазная активность данного штамма менее стабильна при кислых реакциях среды, нежели при щелочных.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 5.VI 1978 г.

ԱՍԽԱԶՐԱՍԻՆ ՅՈՒՐԱՑՆՈՂ ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻՉՄՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ԱՐՏԱԴՐՎՈՂ ԱՑԻԼԱԶՆԵՐԻ ՍԳՏԱԳՈՐԾՄԱՄԲ L-ԼԻԶԻՆԻ ՍՏԱՑՈՒՄԸ

Ա. Ա. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Կուտակիչ կուլտուրաների եղանակով մեկուսացվել է միկոբակտերիայի ածխաջրածին օքսիդացնող *Mycobacterium smegmatis* շտամը, որն ընդունակ է էպսիլոն-բենզոիլ-DL-լիզինը հիդրոլիզացնել առաջացնելով L-լիզին:

էպսիլոն-բենզոիլ-L-լիզինացիլազայի առաջացման և այդ շտամից առավել քանակությամբ կենսազանգվածի կուտակման համար օպտիմալ միջավայր է հանդիսանում Չիրատայի սենդամիջավայրը հեքսադեկանի առկայությամբ: Շտամի առավել ակտիվությունը երևան է գալիս աճի հինգերորդ օրը՝ 30-ում ռեակցիոն խոնուրդի pH-7,2 պայմաններում:

L-LYSINE PREPARATION BY THE USE OF AMINOACYLASE FROM HYDROCARBON UTILIZING MICROORGANISMS

A. A. KHACHATOURIAN, E. G. AFRIKIAN

A strain of *Mycobacterium smegmatis* utilizing hydrocarbons has been isolated which produces aminoacylase hydrolyzing E-benzoyl-DL-lysine with formation of L-lysine. The characteristics of this strain as well as optimal conditions of aminoacylase activity have been described.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. Г. Микробиологический синтез, вып. 1, 1, 1967.
2. Chibata I., Tosa T., Sato T., Mori T., Matsuo Y. Proc. IV JFS: Fermentation technology today (Japan), 383, 1972.
3. Chibata I., Watanabe A., Yamada Sh. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 5, 296, 1957.
4. Кимура Ю., Африкян Э. Г. ДАН СССР, 173, 4, 945, 1967.
5. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Nature, 195, 4836, 80, 1962.
6. Ishikawa T., Tosa T., Chibata I. Agr. Biol. Chem., 26, 9, 581, 1962.
7. Рубан Е. Л., Харцхаева С. В. Микробиологический синтез, 9, III, 1968.
8. Лидере А. Ф., Ирген А. М., Тенисоне Р. А., Зильбере А. М. Тез. докл. V съезда ВМО, Секция: Физиология микробов и техническая микробиология, 218, Ереван, 1975.
9. Хачатурян А. А., Савченко Р. А. Биологический журнал Армении, 23, 7, 40, 1970.
10. Хачатурян А. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1972.
11. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. М.—Л., 1949.
12. Куцева Л. С., Арешкина Л. Я., Клюева Н. М., Скоробогатова Е. П. Прикладная биохимия и микробиология, 1, 2, 217, 1965.