

ного из среды в клетку, наблюдается реальная величина амплитуды гиперполяризации—большая по сравнению с контролем (рис. 2).

Таким образом, ионы калия поступают в клетки *B. flavum* по градиенту электрического поля, но при этом ЛТФ, возможно, является регулятором этого переноса. Причем регуляция может быть как аллостерической, так и происходящей за счет фосфорилирования какого-то белка Trk системы, как это детально обсуждается Стьюартом и др. [10].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Варданян А. Г., Мартиросов С. М. Биофизика, 31, 5, 833, 1986.
2. Варданян А. Г., Гончегулян А. Е., Петросян П. К., Мартиросов С. М. Биофизика, 31, 6, 993, 1986.
3. Ленинджер А. Биохимия. 700, М., 1974.
4. Мартиросов С. М., Трчунян А. А., Варданян А. Г. Биофизика, 27, 1, 48, 1982.
5. Мартиросов С. М., Трчунян А. А. Биофизика, 31, 3, 464, 1986.
6. Штаников А. В., Лившиц В. А., Жданова Н. Н. Генетика, 17, 1419, 1981.
7. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554, 1978.
8. Eisenstadt E. I. Bacteriol., 112, 264, 1972.
9. Martirosov S. M., Petrosian L. S., Tchountun A. A., Vardanian A. G. Bioelectrochem. Bioenerg., 8, 613, 1983.
10. Stewart L. M. D., Huxter E. P., Booth I. R. J. Gen. Microbiol., 131, 77, 1985.

Поступило 30.IX 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 3, 213—219, 1987

УДК 663.1.577.112.38.2

### БИОСИНТЕЗ L-ПРОЛИНА ИЗОЛЕЙЦИНЗАВИСИМЫМИ МУТАНТАМИ *BREVIBACTERIUM FLAVUM* НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ МЕЛАССУ

Э. М. АКОПЯН, Б. И. КАРАБЕКОВ, В. Е. АКСЕНОВСКАЯ,  
А. А. БУДУЛЯН, А. Г. МУРАДЯН, Ф. Н. ТХРУНИ

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

**Аннотация.**—Изучена возможность осуществления биосинтеза L-пролина изолейцинзависимыми мутантами *B. flavum* на питательных средах, содержащих в качестве источника сахара свекловичную и тростниковую мелассу. Установлено, что свекловичная меласса обладает выраженной ингибирующей активностью в отношении биосинтеза этой аминокислоты, в то время как тростниковая, наоборот, стимулирует этот процесс. Эффект от применения этих видов мелассы зависит от их содержания в питательной среде. Определены условия практического применения этих видов сырья для получения L-пролина.

Սնտեսքիս — Ստանանոսիված է L-պրոլինի թիոսինիկը *Brevibacterium flavum* իզոլեյցինից կախված մուտանտների կողմից սնուցող միջավայրում՝ որպես շաքարի աղբյուր օգտագործելով ճակնդեղի և շաքարեղևի մեյասսաները։ Հաստատված է, որ այդ ամրնաթթվի թիոսինիկը եկատմամբ նակնդեղի մեյասսան օժտված է արտահայտիչ արգելակող նատիոթյամբ, այն ղեպրում, երբ շաքարեղևի մեյասսան ընդհակառակն, օժտված է խթանող նատիոթյամբ։ Այդ երկու տեսակի մեյասսաների օգտագործման էֆեկտը կախված է սնուցող միջավայրում երանց պարունակության մակարդակից։ Որոշված էն այդ երկու տեսակի հումքերի գործնական կիրառման պայմանները L-պրոլինի ստացման համար։

**Abstract** — The biosynthesis of L-proline by isoleucine autotrophic mutants of *Brevibacterium flavum* on nutrient media, containing beet-molasses and reed-molasses as a source of sugar was studied. The beet-molasses inhibited the biosynthesis of L-proline, while the reed-molasses stimulated the biosynthesis of this amino acid. These effects depended on the level of two types of molasses in medium. Conditions of practical using of two types of molasses were determined for the production of L-proline.

*Ключевые слова:* мутанты *Brevibacterium flavum* изолейцинзависимые, меласса биосинтез пролина.

Биосинтез L-пролина аукоотрофными по изолейцину штаммами *Brevibacterium flavum* успешно осуществляется на синтетических питательных средах, содержащих источники углерода и азота, минеральные соли, витамины и ростовые факторы, многие из которых имеют низкое значение или являются дефицитными и дорогостоящими [1—5]. Имеются данные о применении для биосинтеза L-пролина технических источников сахара, таких как тростниковая меласса [6, 12]. Однако данных о применении свекловичной мелассы для биосинтеза пролина мы не нашли. Этот вид мелассы является основным сырьем для получения L-лизина в СССР. В связи с этим представляло интерес выяснение возможности применения ее для получения аминокислот, в частности, L-пролина.

**Материал и методика.** В работе в качестве продуцента L-пролина использовали изолейцинзависимый мутант III, который, кроме аукоотрофности по изолейцину, обладает резистентностью к дигидропролину и природно нуждается для роста в тиаминах и биотине. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл на начальной ( $n=200$  об/мин), объем ферментационной среды в колбах составлял 15 мл, аэрация по сульфитному числу—2,8 г.  $O_2$ /л. час. Посевной материал выращивали в течение 16—20 ч и вносили в ферментационную среду в количестве 0,8—1 мл. Процесс биосинтеза осуществляли в течение 72 ч. В качестве посевной среды использовали синтетическую среду следующего состава: глюкоза—3%,  $(NH_4)_2SO_4$ —3%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —1%,  $KH_2PO_4$ —0,1%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,001%,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ —0,001%, L-изолейцин—250 мкг/мл, биотин—450 мкг/л, тиамин—500 мкг/л. (рН 7,1—7,8) При исследовании возможности использования комплексных видов сырья применяли посевную среду следующего состава (%): меласса свекловичная—6% (3% по сахару), гидролизат БВК (гБВК)—2% (аминный азот 0,02—0,025%).

В качестве ферментационной среды использовали синтетическую среду следующего состава: глюкоза—11%,  $(NH_4)_2SO_4$ —5,5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —1%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,001%,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ —0,001%,  $KH_2PO_4$ —0,1%, биотин—450 мкг/л, тиамин—500 мкг/л L-изолейцин—150 мкг/мл,  $CaCO_3$ —5% [13, 14].

В качестве технических источников сахара использовали тростниковую и свекловичную мелассы. При компоновке мелассных питательных сред последними в составе синтетической среды замещали только глюкозу. Остальные компоненты среды использовали в тех же концентрациях, что и в синтетической ферментационной среде.

В качестве технического источника изолейцина применяли гидролизат БВК, который готовили следующим образом: 10%-ную суспензию БВК в 4 н  $H_2SO_4$  автоклавировали при 125° в течение 2,5—3,0 часов. Перед добавлением в среду гБВК нейтрализовали водным раствором аммиака до рН 7,1—7,3. В питательную среду гидролизат БВК вносили вместе с сульфатом аммония, образующимся в результате реакции нейтрализации [10].

Пролин в культуральной жидкости определяли методом хроматографии на бумаге, используя систему *n*-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода в соотношении 4:1:1.

О количестве биомассы судили по величине оптической плотности клеточной суспензии (ФЭК-56 М, кювета 5 мм, длина волны 340 нм) с последующим пересчетом на сухой вес по стандартной кривой. Количество жизнеспособных клеток определяли методом титрования клеточной суспензии на пластинках мясо-пелтонового агара в чашках Петри.

Углеводы определяли методом Бертрама [11]; аминокислотный состав мелассы и гБВК—на аминокислотном анализаторе ААА-339 (СССР).

**Результаты и обсуждение.** Изучение роста мутанта на указанных посевных средах показало, что на синтетической он растет со средней удельной скоростью ( $\mu$ ) 0,37 час<sup>-1</sup> при среднем времени удвоения (*td*) 1,87 ч, что позволяет ему за 24 ч культивирования при практически полной утилизации сахара пройти 12,6 генераций (*n*). Период адаптации мутанта к среде (лаг-фаза *L<sub>c</sub>*) не превышает 6 ч (табл. 1).

Таблица 1. Динамика роста мутанта III на синтетической и мелассной посевных средах

№№ проб	Время выращивания, ч	Биомасса X (титр клеток в 1 мл)		Удельная скорость роста $\mu$ , ч <sup>-1</sup>		Время удвоения <i>td</i> , ч		Количество генераций, <i>n</i>	
		глюкоза	меласса	глюкоза	меласса	глюкоза	меласса	глюкоза	меласса
1	0	$4,7 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$	—	—	—	—	—	—
2	2	$5,5 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$	0,096	0,09	7,4	8,0	0,27	0,25
3	4	$6,9 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$	0,095	0,64	7,4	1,09	0,27	1,84
4	6	$1,8 \times 10^7$	$5,24 \times 10^6$	0,48	0,88	1,46	0,80	1,37	2,51
5	8	$8,4 \times 10^6$	$2,55 \times 10^6$	0,77	0,81	0,90	0,88	2,2	2,28
6	10	$6,2 \times 10^6$	$3,23 \times 10^6$	0,99	0,11	0,70	6,25	2,86	0,32
7	12	$5,5 \times 10^6$	$7,81 \times 10^6$	1,09	0,45	0,64	1,56	3,12	1,28
8	14	$1,25 \times 10^{10}$	$6,43 \times 10^6$	0,41	1,05	1,77	0,66	1,18	3,02
9	16	$2,0 \times 10^{10}$	$2,51 \times 10^{10}$	0,23	0,68	2,98	1,025	0,67	1,95
10	18	$2,6 \times 10^{10}$	$3,25 \times 10^{10}$	0,13	0,12	5,26	5,7	0,38	0,35
11	20	$2,9 \times 10^{10}$	$3,71 \times 10^{10}$	0,055	0,07	12,5	9,5	0,16	0,21
12	22	$3,0 \times 10^{10}$	$4,12 \times 10^{10}$	0,017	0,05	41,7	13,3	0,05	0,15
13	24	$3,1 \times 10^{10}$	$4,14 \times 10^{10}$	0,016	0,002	41,7	346,5	0,05	0,006

Средние показатели роста за 24 ч

0,37 0,41 1,87 1,7 12,6 14,2

При применении в качестве посевной среды мелассы и гБВК вдвое сокращается лаг-фаза (*L<sub>c</sub>*), несколько увеличиваются  $\mu$  и другие физиологические параметры роста мутанта (*td* и *n*). Однако обращает на себя внимание двуфазный характер динамики роста мутанта на мелассной среде (табл. 1), свидетельствующий о содержании в мелассе другого, кроме сахарозы, источника углерода в виде органических кислот (испытанные нами партии свекловичной мелассы содержали до 20 г/л молочной кислоты).

Таким образом, на основании полученных результатов можно считать, что свекловичная меласса и гБВК в примененных концентрациях хорошо обеспечивают ростовые потребности изолейцинозависимого мутанта III В. *flavit*—продуцента пролина.

Для выбора оптимального количества мелассы, обеспечивающего наибольший выход пролина у мутанта, глюкозу в синтетической фермен-

тационной среде частично или полностью замешали свекловичной или тростниковой мелассой с таким расчетом, чтобы конечное содержание сахара было на уровне 11%. На рис. 1 приведены данные, характеризующие выход биомассы, пролина и удельную продуктивность у мутанта

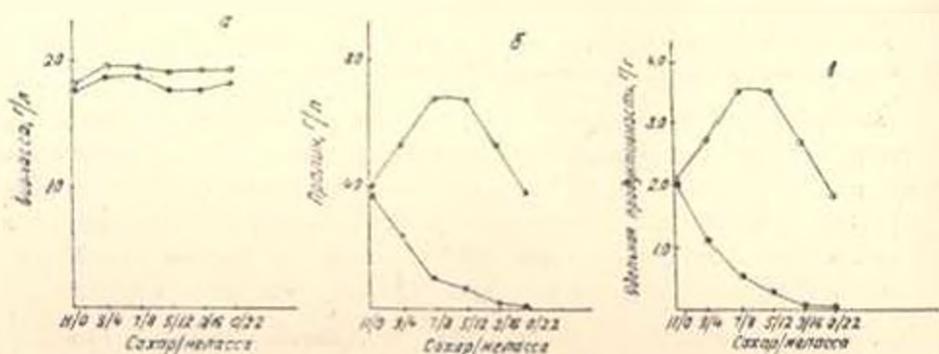


Рис. 1. Выход биомассы (а), l-пролина (б) и удельная продуктивность (г) мутанта III в зависимости от концентрации в среде свекловичной (●—●) и тростниковой (○—○) меласс. По оси абсцисс: в числителе процент сахара (г/г) в среде, в знаменателе процент мелассы в среде.

в зависимости от концентрации мелассы в среде. Видно, что выход биомассы при разных концентрациях мелассы в ферментационной среде по сравнению с таковой на синтетической среде (11% глюкозы) не претерпевает существенных изменений. При применении свекловичной мелассы биосинтез l-пролина резко ингибируется и при полной замене сахара на мелассу—0/22—он практически не имеет места. Напротив, применение тростниковой мелассы приводит к усилению биосинтеза l-пролина и к соответствующему увеличению удельной продуктивности мутанта, а при полной замене сахара в среде на тростниковую мелассу—0/22—уровень биосинтеза l-пролина остается такой же, как на синтетической среде—110.

Поскольку в литературе явление ингибирования биосинтеза l-пролина свекловичной мелассой, а также механизмы этого явления не обсуждались, мы сочли интересным выяснить его причины.

В связи с тем, что свекловичная и тростниковая мелассы отличаются друг от друга по аминокислотному составу (табл. 2), было естественно именно в аминокислотной фракции искать причину ингибирования процесса биосинтеза l-пролина свекловичной мелассой. Для этого свекловичную мелассу подвергали обработке на ионообменных смолах. Были получены две партии обработанной мелассы: одна, обработанная катионитом (КУ 2Х8), не содержала аминокислот, другая, обработанная анионитом (АВ-17), содержала все аминокислоты, присутствующие в исходной мелассе. Эти партии мелассы включали в состав синтетической среды взамен сахара (глюкозы) в двух вариантах: с исключением из состава среды солей и витаминов («микродобавки») и без изменения остального компонентного состава среды. В качестве контроля использовали синтетическую ферментационную среду. Получен-

Таблица 2. Химический состав свекловичной и тростниковой меласс

Наименование показателей	Свекловичная меласса	Тростниковая меласса
pH	6.0—6.4	5.5—5.8
Общий сахар, вес. %	51.0—51.8	54—60
Прямой сахар, вес. %	2.6—5.6	20—28
Зола, вес. %	7.3—8.4	5—9
Сухие вещества, вес. %	72.9—74.5	70—70
Общий калий, вес. %	3.1—3.6	2—3
Общий фосфор, мг %	42.6—44.7	150—180
Кальций, мг %	645—792	500—180
Аминокислоты, мг %		
Гистидин	0—40	—
Аргинин + лизин	12—41	—
Аспарагин	12—36	4—6
Треонин	18—34	—
Серин	49—106	—
Глутамин	14.3—475	—
Пролин	20—87	—
Глицин	14—80	—
Аланин	37—89	5—10
Валин	11—93	—
Метионин	2—30	—
Изолейцин + лейцин	50—208	—
Тирозин	11—51	—
Фенилаланин	0—100	—
Триптофан	4—5	—
Витамины, мкг/л		
Тиамин	1.3	8.3
Биотин	0.053	12.0
Рибофлавин	0.41	2.51
Никотиновая кислота	51.0	21.0
Пантотеновая кислота	1.3	21.4
Фолиевая кислота	2.1	0.038
Пиридоксин	5.4	6.5

ные данные подтверждают предположение о том, что ингибирующая активность свекловичной мелассы связана с ее аминокислотной фракцией и, по-видимому, с изолейцином, поскольку именно эта аминокислота у изолейцинзависимых мутантов-продуцентов L-пролина является регулятором биосинтеза. И, действительно, исключив из состава синтетической среды изолейцин при применении свекловичной мелассы, мы убедились, что ингибирующий эффект ее на биосинтез L-пролина значительно снижается, а отсутствие в среде этой аминокислоты компенсируется изолейцином мелассы. На рис. 2 для сравнения приведены данные о биосинтезе L-пролина мутантом III на синтетической ферментационной среде в зависимости от концентрации L-изолейцина в среде. Видно, что высокий выход L-пролина достигается тогда, когда в синтетической среде лишь 4—5% сахара (из 11%) заменяется свекловичной мелассой (8—10%). Полная замена сахара мелассой, по-видимому, приводит к некоторому избытку L-изолейцина в среде, о чем свидетельствует схожесть профилей кривых зависимости выхода пролина от концентрации L-изолейцина в синтетической среде и от концентрации мелассы. Полученные данные свидетельствуют о том, что количество изолейцина, вносимое в среду в составе свекловичной мелассы, вполне удовлетворяет потребностям мутанта для успешного осуществления биосинтеза пролина.

Таким образом, эксперименты со свекловичной мелассой в качестве источника углерода показали возможность ее использования для получения L-пролина. При этом было установлено, что концентрация ее в питательной среде не должна превышать 10% (5% по сахару). Дефицит сахара в среде в этом случае должен быть возмещен внесением чистой глюкозы (или пищевого сахарного песка).

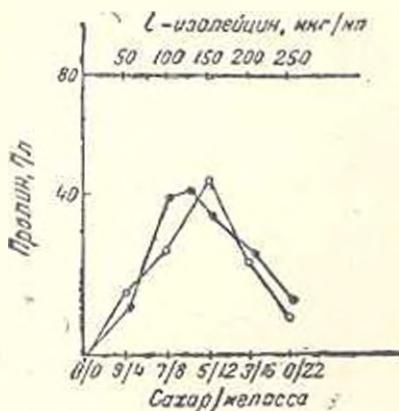


Рис. 2.

Рис. 2. Биосинтез L-пролина из среде без изолейцина, содержащей различные концентрации свекловичной мелассы (●—●) и на синтетической среде с различными концентрациями L-изолейцина (○—○). По оси абсцисс в числителе процент глюкозы в среде, в знаменателе процент мелассы в среде.

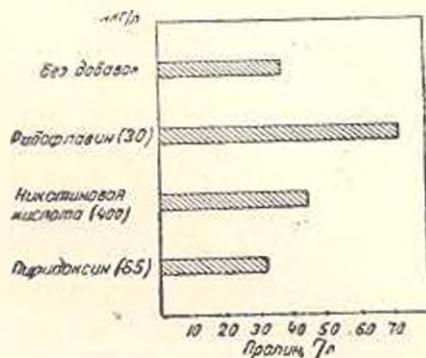


Рис. 3.

Рис. 3. Влияние витаминов на биосинтез пролина мутантом III.

На основании результатов проведенных исследований была выявлена возможность и установлены условия применения названных видов меласс для получения L-пролина микробиологическим синтезом, но вопрос о причинах стимулирования синтеза этого продукта при применении более низких концентраций тростниковой мелассы оставался невыясненным.

Сравнивая химический состав тростниковой и свекловичной меласс (табл. 2), можно убедиться, что первый значительно богаче некоторыми витаминами. Для выяснения возможной роли этих витаминов была проведена серия экспериментов с использованием среды с витаминами (рис. 3).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что стимулирующий эффект тростниковой мелассы на биосинтез L-пролина, по-видимому, в большой степени зависит от содержания в ней витаминов, в частности, рибофлавина, стимулирующая роль которого в концентрации 30 мкг/л особенно выражена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Патент США, № 3329577, 1967.
2. Патент США, № 3650899, 1972.
3. Патент США, № 4224409, 1980.
4. Патент ФРГ, № 1172903, 1969.
5. Патент ФРГ, № 1189941, 1970.

6. Патент Великобритании. № 2077262 А, 1981.
7. Ганчев К. Л., Жумов Г. Ш., Христова Г. Х., Мургов И. Д. В кн.: Биотехнология и бионженерия. Тез. докл., 2. Рига, 1986.
8. Мухиня Г. Р., Дунце М. Э. Обзор: Новые виды сырья для микробиологических производств. М., 1978.
9. Лиспиновш Г. К., Дунце М. Э. В кн.: Сырье и питательные субстраты для промышленной микробиологии. Рига, 1986.
10. Зайцева Э. М., Комвалов Л. В. Приклад биохимия и микробиол., 22, 3, 318—355, 1986.
11. Белозерский А. И., Проскуряков И. И. Практическое руководство по биодинамике растений. 12—17, М., 1951.
12. Araki K., Takasawa Y., Nakajima J. Agr. Biol. Chem., 39 (6), 1193—1200, 1975.
13. Yoshinaga F. J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 367—398, 1969.
14. Yoshinaga F., Yoshinaga Y., Okumura Sh., Katsuya H. J. Gen. Appl. Microbiol., 13, 203—210, 1967.

Поступило 27.1 1987 г.

## ВЛИЯНИЕ *p*-ХЛОРМЕРКУРИБЕНЗОАТА НА L-ЛИЗИН-2-МОНООКСИГЕНАЗУ ИЗ *PSEUDOMONAS* *sp.*

Г. Э. ХАЧАТРЯН, Т. Р. КАЗАРЯН, А. Л. СИМОНЯН

Ереванский физический институт ГКНАЭ СССР

**Аннотация** — Изучено влияние *p*-хлормеркурибензоата на активность L-лизин-2-монооксигеназы из двух штаммов рода *Pseudomonas*. Показана трансформация оксигеназной активности фермента в оксидазную

**Նկատարում** — Ինտենսիվորեն է պարզվել *p*-քլորմերկուրիենթոատի ազդեցությունը *Pseudomonas* սեղի երկու շտամների L-լիզին-2-մոնօօքսիգենազի ակտիվության վրա: Նույն է տրված ֆերմենտի օքսիգենազային ակտիվության վերափոխումն օքսիդազային:

**Abstract** — The influence of *p*-chloromercurybenzoate on L-lysine-2-monooxygenase activity from two strains of *Pseudomonas* species is investigated. The transformation of oxygenase activity of enzyme into an oxidase one is shown.

**Ключевые слова** L-лизин-2-монооксигеназа, трансформация, *p*-хлормеркурибензоат, *Pseudomonas* *sp.*

Химическая модификация функциональных групп молекул ферментов часто сопровождается изменением их каталитических свойств. Известно, что при некоторых патологических состояниях, например, вследствие облучения [2], происходят качественные изменения активности ферментов, т. е. трансформация. Изыскание способов избирательного блокирования таких изменений в принципе может быть использовано для создания новых лечебных средств. Кроме того, сопоставление свойств природных и трансформированных ферментов может быть интересным для решения фундаментальных проблем биокатализа [1].