

УДК 576.809.581.13

МИКРОБИОЛОГИЯ

З. В. Маршавина, Е. Н. Макарова, А. Р. Мхитарян

Влияние источников азота на накопление лизина в культуральной среде и в клетках бактерий

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР В. М. Мхитаряном 22/1 1975)

Вопросы регуляции биосинтетических процессов у микроорганизмов, связанные, в частности, с усилением возможностей сверхсинтеза отдельных, наиболее ценных аминокислот у ауксотрофных мутантов, привлекают в последнее время интерес многочисленных исследователей (1-3).

Одним из регулирующих факторов в синтезе аминокислот является изменение состава питательной среды и, в первую очередь, изменение источника азота (4-6).

Настоящая работа посвящена изучению некоторых особенностей влияния сульфата аммония и глутаминовой кислоты на накопление свободного внутриклеточного и внеклеточного лизина у ауксотрофных мутантов—продуцентов этой аминокислоты.

Объектом исследования служили *Corynebacterium glut.* шт. 95, 28, 8 и *Brevibacter.* шт. 22—ауксотрофные мутанты, продуценты лизина.

Культуральная среда имела следующий состав (%): глюкоза—10; KH_2PO_4 —0,03; K_2HPO_4 —0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,03; DL—метионин—0,04; DL—треонин—0,1; биотин—0,002 мг/100 мл. Для инкубации *Brevibacterium* шт. 22 к этой среде добавляется тиамин—0,02 мг/100 мл (7); мел—2. В качестве источников азота служили: сульфат аммония—2; DL—глутаминовая кислота—4,4. pH среды 7,2—7,5. Инкубация проводилась в пробирках диаметром 2 см с 5 мл среды на качалках при 28° в течение 72-х часов. Посевным материалом служила суточная культура с рыбного агара в виде суспензии. В каждый вариант вносилось 0,4—0,6 мг абс. сух. в.

В конце опыта биомасса, после тщательного промывания холодной дистиллированной водой и отделения от мела, определялась нефелометрическим методом и экстрагировалась 80%-ным кипящим этанолом с гидромодулем 30 в течение часа. Для обнаружения внутриклеточных аминокислот экстракты подвергались хроматографированию в растворителе бутанол: уксусная кислота: вода (4:1:1) по методу Лисицкого

и Лорана (8). Внеклеточный лизин определялся методом высоковольтного электрофореза в муравьино-уксуснокислом буфере pH 3,1 (9). Проявка аминокислот проводилась 0,2% нингидрином в ацетоне.

В табл. 1 приведены средние данные из 4—6 повторностей, показывающие накопление внеклеточного лизина при использовании различных источников азота у 4-х исследуемых культур

Таблица 1

Влияние источников азота на потребление глюкозы, прирост биомассы и накопление внеклеточного лизина

Культурн	Потребленная глюкоза, мг/10 мл		Прирост биомассы, мг абс. с. в./10 мл		Внеклеточный лизин, г/л	
	NH ₄ ⁺ DL—Глу		NH ₄ ⁺ DL—Глу		NH ₄ ⁺ DL—Глу	
<i>C. glutamicum</i> шт. 95	898	450	42	20	11.3	0
<i>C. glutamicum</i> шт. 28	718	520	39	12	10.3	0
<i>C. glutamicum</i> шт. 8	738	430	30	12	10.8	0
<i>Brevibacterium</i> шт. 22	620	400	30	14	8.2	0

Результаты, приведенные в табл. 1, свидетельствуют о том, что усвоенное аммиака обеспечивает довольно высокий, для синтетических сред, выход лизина (в среднем 11 г/л). Усвоение глутаминовой кислоты также происходит, о чем свидетельствует, хотя и более низкий, уровень потребленной биомассы. Но при усвоении этого источника азота внеклеточный лизин не накапливается в определяемых количествах.

Поскольку биосинтез аминокислот происходит в клеточном обменном фонде, то, естественно, возникающий вопрос заключается в том—имеет ли место биосинтез лизина внутри клеток вообще, когда источником азота является глутаминовая кислота. С этой целью наряду с внеклеточным лизином, были изучены свободные внутриклеточные аминокислоты.

Результаты анализа аминокислотного состава спирторастворимой фракции 4-х культур при усвоении сульфата аммония и глутаминовой кислоты показаны на рис. 1.

Прежде всего необходимо отметить, что источники азота существенным образом влияют как на качественный, так и количественный состав аминокислот спирторастворимой фракции. Сульфат аммония обеспечивает более полный набор аминокислот у всех штаммов. Преобладающими аминокислотами здесь являются глутаминовая кислота, лизин, аланин, валин-метионин, фенилаланин. Другие аминокислоты присутствуют в виде следов. При усвоении DL—глутаминовой кислоты аминокислотный обменный фонд культур более беден. Здесь полностью отсутствуют валин с метионином и лейцин, а фенилаланин находится в виде следов, меньше аланина.

Представляет интерес тот факт, что в клетках не обнаруживается треонин ни у одной из культур на обоих источниках азота и метионин при выращивании на глутаминовой кислоте (на сульфате аммония найдено большое количество валина, который находится в одном пятне с

метионином), несмотря на то, что эти аминокислоты довольно в большом количестве присутствуют в питательной среде, как ее компоненты.

Наблюдаются и межкультуральные особенности аминокислотного состава в зависимости от источника азота. Так клетки *Brevibacterium* шт. 22 по аминокислотному составу отличаются от клеток *C. glut.* шт. 95, 28, 8, выращенных на среде с сульфатом аммония. В этом случае у *Brevibacterium* обнаруживается очень много лизина, почти нет фенилаланина и мало валина с метионином. Возможно, что высокий уровень содержания внутриклеточного лизина является причиной того, что в культуральной среде накопление этой аминокислоты несколько занижено по сравнению с *C. glutamicum*. Аминокислотный состав 3-х штаммов *C. glutamicum* при усвоении этого источника азота — идентичен.

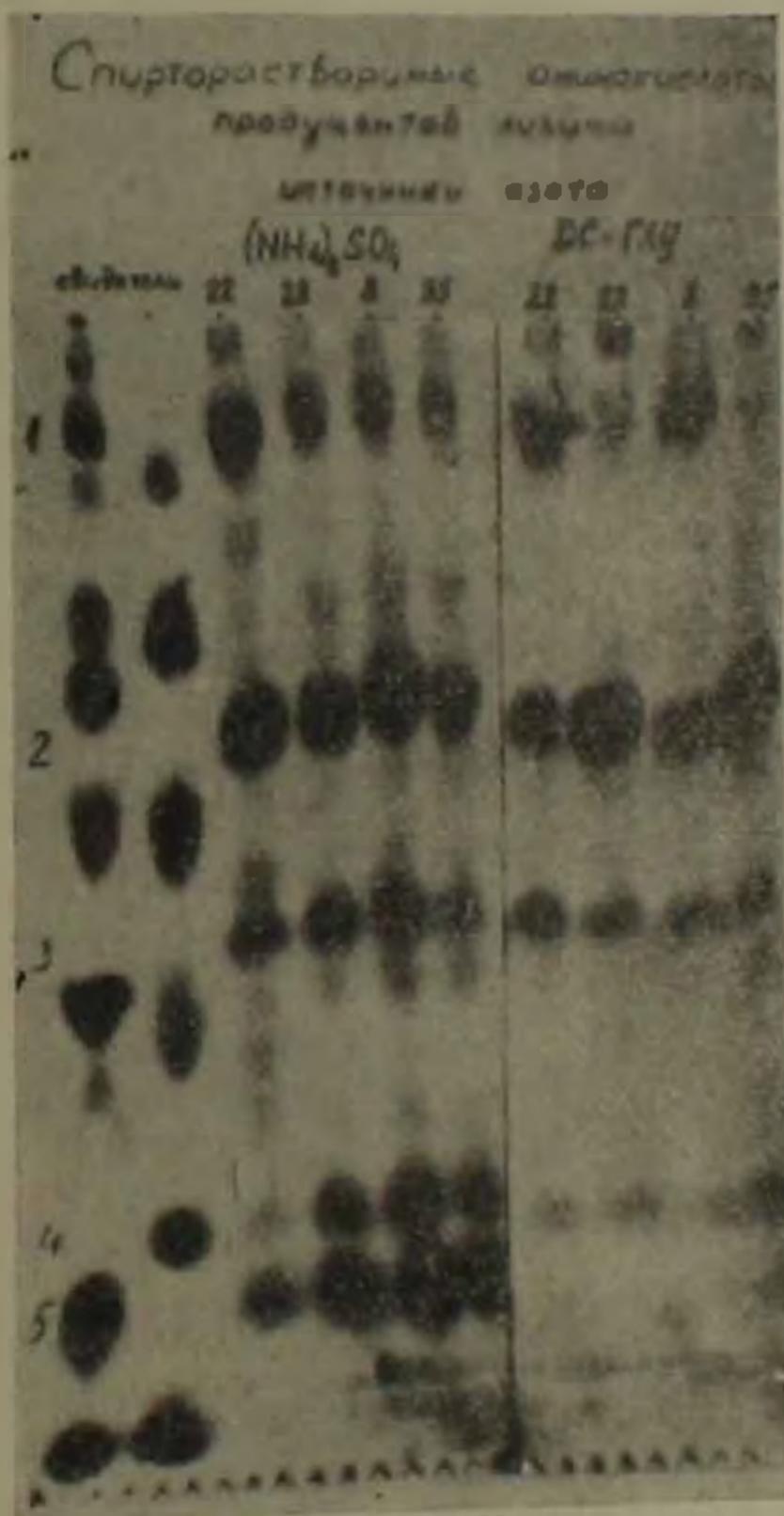


Рис. 1. Спирторастворимые аминокислоты *Brevibacterium* шт. 22(А) и *Corynebacterium glutamicum* шт. 28(Б), 8(В), 95(Г)

При выращивании культур в среде с DL-глутаминовой кислотой они, по аминокислотному составу, разделились на 2 группы. *Brevibacterium* шт. 22 и *S. glutamicum* шт. 8 отличаются тем, что глутаминовая кислота, проникнувшая из среды не накапливается в клетках, а подвергается обмену, в результате чего у этих культур накапливается большое количество лизина. Однако лизин не выделяется из клеток в культуральную жидкость. *S. glutamicum* шт. 95 и 28 отличаются высоким содержанием проникнувшей из среды глутаминовой кислоты. Она накапливается и не подвергается метаболизму, в результате чего в клетках нет лизина, нет и других аминокислот. В пользу такого предположения говорит и то, что накопление лизина в культуральной жидкости не происходит, значит его отсутствие в клетках не связано с выходом в окружающую среду.

Таким образом, DL-глутаминовая кислота, как основной источник азота, усваивается ауксотрофными мутантами *S. glutamicum* шт. 95, 28, 8 и *Brevibacterium* шт. 22, свидетельством чему является прирост биомассы. Однако усвоение носит относительный характер, так как биомасса не отличается полноценностью с точки зрения аминокислотного состава обменного фонда, который состоит, в основном, из 2-х или 3-х аминокислот (лизин, глутаминовая кислота, аланин). Кроме того, биомасса не обладает способностью накапливать внеклеточный лизин в большом количестве. Тем не менее биосинтез лизина в клетках *Brevibacterium* шт. 22 и *S. glutamicum* шт. 8 происходит. Это дает возможность предполагать, что отсутствие этой аминокислоты в культуральной жидкости связано с возможностью выхода ее из клеток, т. е. с вопросом клеточной проницаемости.

У *S. glutamicum* шт. 95, 28 лизин не найден в клетках, но в большом количестве содержится проникнувшая из среды глутаминовая кислота. Можно предположить, что в клетках глутаминовая кислота очень слабо подвергается метаболизму, аминокислоты синтезируются в незначительном количестве, которые, по-видимому, включаются в белок, тем самым обеспечивая рост биомассы, а накопление лизина в клетках не происходит.

При усвоении сульфата аммония, как основного источника азота, пул более богат как по уровню содержания, так и по набору аминокислот. Что касается лизина, то его содержание в клетках и в культуральной жидкости находится в обратной зависимости.

Институт микробиологии
Академии наук Армянской ССР

Զ. Վ. ՄԱՐԵԱՎԻԿ, Ե. Ն. ՄԱՎԱՐՈՎԱ, Ա. Ռ. ՄԿԻՔԱՐՅԱՆ

Ազոտի աղբյուրների սպեկտրային կոլստրալ միջավայրում
և բակտերիաների բջիջներում լիզինի կուտակման վրա

Աշխատանքը նվիրված է ամոնիումի սուլֆատի և գլյուտամինաթթվի սպեկտրային մի քանի առանձին հատկությունների ուսումնասիրությանն ազատ

ներբջջային և արտաբջջային լիզինի կուտակման վրա՝ այդ ամինաթթուն արտադրող աուքսոտրոֆ մուտանտների մոտ:

Հետազոտման օբյեկտ են հանդիսացել լիզին արտադրող աուքսոտրոֆ մուտանտները *C. glutamicum* շտ. 8, 28, 95 և *Brevibacterium* շտ. 22:

Կարելի է հնթադրել, որ բջիջներում գլյուտամինաթթուն շատ թույլ է ընդգրկվում նյութափոխանակության մեջ, ամինաթթուները սինթեզվում են աննշան քանակությամբ, որոնք էլ, ըստ երևույթին, ներգրավվում են սպիտակուցի մեջ, դրանով իսկ ապահովելով կենսազանգվածի սփռ, իսկ լիզինի կուտակում բջիջներում տեղի չի ունենում:

Լեմոնիումի սուլֆատի՝ որպես ազոտի հիմնական աղբյուրի յուրացման դեպքում, ազատ ամինաթթվային ֆոնդն ավելի հարուստ է ամինաթթուների պարունակության մակարդակով և նրանց հավաքածուով:

Ինչ վերաբերում է լիզինին, ապա նրա պարունակությունը բջիջներում և կուլտուրայի հեղուկում գտնվում է հակադարձ հարաբերության մեջ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ C. M. Brown, S. O. Stanley, J. Appl. Chem and Biotechnol 22, 3, 363 (1972).
² A. L. Demain, J. Appl. Chem. and Biotechnol 22, 3, 315 (1972). ³ I. Kato, M. Kishimi, L. Chibata, Appl. Microbiol. 23, 4, 758 (1972). ⁴ Յ. Վ. Маршавина, Е. Н. Макарова, „Микробиология“, т. 43, 3, 493 (1974). ⁵ Յ. Վ. Маршавина, С. Г. Асланян, Получение и применение аминокислот. Изд. „Зинатне“, Рига, 1970. ⁶ И. Д. Мурзов, Э. М. Зайцева, Прикл. биохим. и микробиол., т. 9 (1973). ⁷ Л. С. Куцева, Н. М. Клюева, Прикл. биохим. и микробиол., т. 6, 2, 158 (1970). ⁸ S. Lissitsky, G. Lonpreul, Bull. soc. Biol. 37, 1177 (1955). ⁹ С. В. Гордиенко, А. Н. Козлова, В. М. Беликов Журнал прикл. химии, т. 39, 958 (1966).