

З. В. МАРШАВИНА, Дж. А. ГЕВОРКЯН, Е. Р. АЛЕКСАНЯН

## АСПАРТАТКИНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОДУЦЕНТОВ ЛИЗИНА

Изучалась аспартаткиназная активность, рост биомассы и биосинтез лизина у мутантных культур *Corynebacterium glutamicum*, шт. 95 и *Brevibacterium*, шт. 22, и у исходной культуры—*M. glutamicus*, шт. 13032. Аспартаткиназная активность культуры имеет самые высокие значения в интактных клетках и достигает своего максимума через 48 ч. инкубации.

Общим энзимом в биосинтезе аминокислот аспарагинового семейства и лизина является аспартаткиназа (АТФ:1-аспартат-4-фосфотрансфераза, 2.7.2.4.), активность которой у многих микроорганизмов контролируется конечными продуктами биосинтеза—треонином и лизином [3, 6, 7—9]. Однако накопленные в последнее время факты свидетельствуют, во-первых, о нестрогой специфичности фермента, во-вторых, о существовании предпочтительной конверсии промежуточных метаболитов в конечные продукты у мутантных форм, что связано, по-видимому, с отсутствием контроля. Известны факты, когда биосинтез лизина у мутантных культур контролировался, помимо треонина и лизина, также валином, лейцином, изолейцином и метионином [1, 10].

Целью настоящей работы явилось изучение аспартаткиназной активности культур—продуцентов лизина (*Corynebacterium glutamicum*, шт. 95 и *Brevibacterium*, шт. 22) в динамике роста под влиянием некоторых аминокислот и установление связи ферментативной активности с процессом лизинообразования в различных культуральных условиях.

Ранее сообщалось нами о регуляторной роли аланина, аспарагиновой кислоты и ее амида в биосинтетической активности ауксотрофов-продуцентов лизина [2].

*Материал и методика.* В работе использовали гомосеринзависимые мутанты—*C. glutamicum*, шт. 95 и *Brevibacterium*, шт. 22, а в качестве контроля—исходный штамм *M. glutamicus* 13032.

Посевным материалом служила односуточная культура, выращенная на сухом питательном агаре.

Опыты проводили в 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;  $\text{CaCO}_3$ —2,0; ДЛ-метионин—400 мкг/мл; ДЛ-треонин—1000 мкг/мл; биотин—20 мкг/мл; для *Brevibacterium*, шт. 22—тиамин—100 мкг/л. К такой среде в качестве стимуляторов роста добавляли в отдельности ДЛ-аланин, ДЛ-аспарагиновую кислоту или Л-аспарагин в количестве 0,01М.

Опыты ставили в 250 мл колбах, содержащих 25 мл среды, на круговой качалке, в термокамере при температуре 29—30°C. Пробы брали через 24, 48 и 72 часа инкубации. pH среды в течение ферментации поддерживали на уровне 7,0.

Полученную биомассу промывали дважды холодным физиологическим раствором, затем 0,2 М трис-НСI буфером (рН 8,0), часть ее в виде суспензии в том же буфере брали для определения ферментативной активности интактных клеток, остальное же количество использовали для получения бесклеточного экстракта. Клетки разрушали в гомогенизаторе для клеток и бактерий Л-17 (приставка к центрифуге ЦЛР-1) вместе с бусинками Баллотини (соотношение бусинок, биомассы и буфера 3:2:2) в течение 15 мин, при 0°C. Разрушенные клетки отделяли центрифугированием (3000 об/мин, два раза по 20 мин), при 0°C.

Об активности фермента судили по образованию неорганического фосфора (из аденозин-5-трифосфорной кислоты), концентрацию которого определяли методом Лоури и Лопеза [4]. Результаты выражали в микромолях фосфора на 1 мг белка за 1 час.

Белок определяли методом Лоури [5], лизин культуральной жидкости—методом бумажной хроматографии в системе растворителей бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1), биомассу—турбидиметрическим методом на ФЭК-М одним светофильтром, глюкозу культуральной жидкости—микрометодом Хагедорна-Йенсена.

**Результаты и обсуждение.** Результаты изучения влияния кислотности (рН) среды, продолжительности инкубации и скорости центрифугирования гомогената на аспараткиназную активность у *S. glutamicum*, шт. 95 представлены в табл. 1. Полученные данные показали, что аспараткиназа имеет максимальную активность в трис-НСI буфере при рН 8,0; активность фермента повышается параллельно с увеличением продолжительности инкубации реакционной смеси; наибольшая активность надосадочной жидкости наблюдается при скорости центрифугирования гомогената 3000 об/мин.

Таблица 1

Влияние рН, продолжительности инкубации и скорости центрифугирования гомогената на аспараткиназную активность у *S. glutamicum*, шт. 95

Трис-НСI буфер, рН	Активность, мкмоль Р/мг белка	Скорость центрифугирования гомогената, об/мин	Активность, мкмоль Р/мг белка	Время инкубации реакционной смеси в ультратермостате, мин	Активность, мкмоль Р/мг белка
7,5	3,0	3000	13,6	15	0
8,0	5,5	5000	12,2	30	1,3
8,5	5,0	10000	12,1	45	2,7
9,0	4,3	15000	9,6	60	5,5
—	—	—	—	120	9,3

Таблица 2

Аспараткиназная активность у *S. glutamicum*, шт. 95 в динамике роста культуры

Время инкубации, час	Активность фермента, мкмоль Р/мг белка за 1 час		
	интактные клетки	гомогенат	осадок
24	45,5	3,5	31,6
48	68,6	7,6	18,8
72	20,6	2,1	8,3

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что уровень аспараткиназной активности у культуры *S. glutamicum*, шт. 95 зависит от

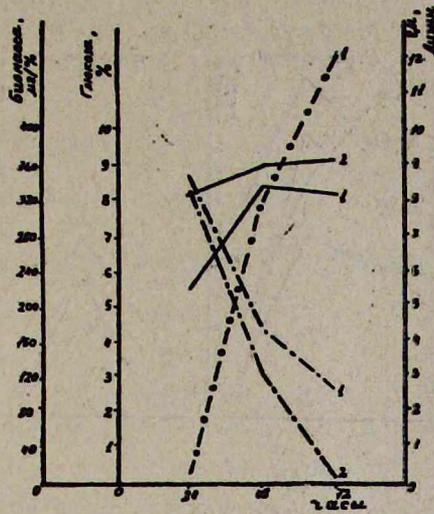


Рис. 1. Рост и биосинтез лизина у мутанта *C. glutamicum*, шт. 95 (1) и исходной культуры *M. glutamicus*, шт. 13032 (2). — биомасса; — — — глюкоза; — ○ — лизин.

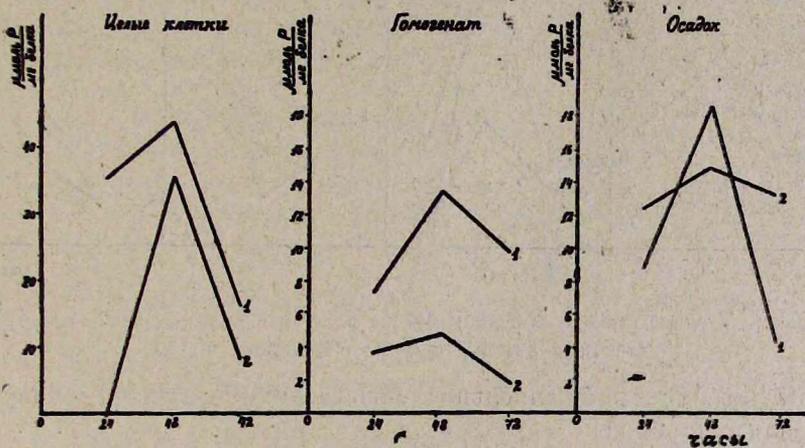


Рис. 2. Аспартагкиназная активность *C. glutamicum*, шт. 95 (1) и *M. glutamicus*, шт. 13032 (2).

возраста культуры и повышается в экспоненциальной фазе роста, достигая максимума к концу этого периода и в начале стационарной фазы (к 48 часу инкубации). Заметим, что к этому времени отмечается также максимальный рост биомассы и биосинтез лизина, после чего, по-видимому, снижается потребность клеток в ферменте. Кроме того, данные табл. 2 говорят о том, что интактные клетки по сравнению с бесклеточным экстрактом обладают большей аспартагкиназной активностью. Возможно, это связано с преимущественной локализацией фермента у поверхности клеток, о чем свидетельствует и снижение ак-

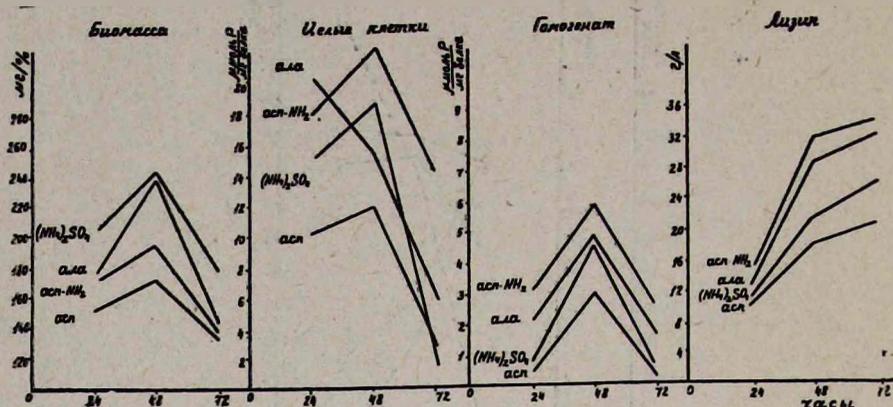


Рис. 3. Влияние аминокислот (0,01 М) на рост, биосинтез лизина и аспартакиназную активность у *S. glutamicum*, шт. 95.

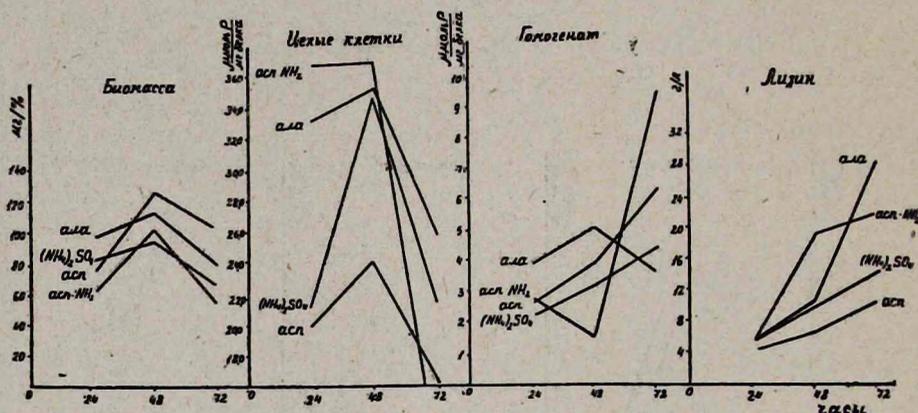


Рис. 4. Влияние аминокислот (0,01 М) на рост, биосинтез лизина и аспартакиназную активность у *Brevibacterium*, шт. 22.

тивности гомогената параллельно с повышением скорости его центрифугирования (табл. 1).

Что же касается исходной культуры—*M. glutamicus*, шт. 13032 (рис. 1), то она отличается хорошим ростом, усваиванием глюкозы, однако не проявляет биосинтетических свойств, а по ферментативной активности она уступает мутантной культуре—*S. glutamicum*, шт. 95, у которой высокая аспартакиназная активность соответствует высокому выходу лизина (рис. 2).

Данные о роли аланина, аспарагиновой кислоты и аспарагина в качестве незначительных добавок к среде аммония говорят или о стимуляции, или об ингибировании биосинтетической и ферментативной активности *S. glutamicum*, шт. 95 и *Brevibacterium*, шт. 22 (рис. 3, 4).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что стимулирующее влияние аланина и аспарагина на рост и биосинтез лизина совпадает также и с более высокой аспартакиназной активностью культур. Добав-

ка же аспарагиновой кислоты вызывает некоторое торможение процессов жизнедеятельности культур, это касается также активности аспараткиназы.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 6.X 1975 г.

Չ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Չ. Ա. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ե. Ի. ԱԼԵՔՍԱՆՅԱՆ

ԼԻԶԻՆԻ ՊՐՈԴՈՒԹՅԵՆՏՆԵՐԻ ԱՍՊԱՐՏԱՏԿԻՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել են *Corynebacterium glutamicum* շտ. 95 և *Brevibacterium* շտ. 22 մուտանտների, ինչպես նաև ստուգիչ կուլտուրայի *M. glutamicus* շտ. 13032-ի, ասպարտատկինազային ակտիվությունը, կենսազանգվածի աճը և լիզինի բիոսինթեզը: Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ ասպարտատկինազային ակտիվությունը մուտանտ կուլտուրաների մոտ ամենաբարձրն է ամբողջական բջիջներում, այն իր մաքսիմումին է հասնում ինկուբացիայի 48-րդ ժամին, որը համընկնում է այդ կուլտուրաների ընդհանուր բիոսինթետիկ ակտիվության բարձրացման հետ: Ալանինի և ասպարագինի աննշան քանակների (0,01 մոլ) ավելացումը միջավայրին բարերար ազդեցություն է թողնում ինչպես աճի ու լիզինի բիոսինթեզի վրա, այնպես էլ բարձրացնում է ֆերմենտի ակտիվությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Зайцева З. М., Чернышева И. П. Прикл. биох. микробиол., 11, 3, 350, 1975.
2. Мариавина З. В., Геворкян Дж. А. Прикл. биох. микробиол., 10, 2, 200, 1974.
3. Filer D., Rosenberg E., Kindler S. H. J. Bacteriol., 115, 23, 1973.
4. Lowry O. H., Lopez J. A. J. Biol. Chem., 162, 421, 1946.
5. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. J., Randal R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
6. Miyajima R., Otsuka S., Shito I. J. Biochem., 63, 139, 1968.
7. Nakayama K., Tanaka H., Hagino H., Kinoshita S. Agr. Biol. Chem., 30, 6, 611, 1966.
8. Rosner A., Paulus H. J. Biol. Chem., 246, 9, 2965, 1971.
9. Shito I., Miyajima R. J. Biochem., 65, 6, 849, 1969.
10. Shito I., Miyajima R., Sano K. J. Biochem., 68, 5, 701, 1970.