



Генноінженерна біотехнологія

УДК 575.1:576.851.5

О. О. Кальчева, М. М. Файзієв, І. Штиряк, С. С. Малюта

СКРИНІНГ РІЗНИХ ШТАМІВ STREPTOCOCCUS BOVIS ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПОТЕНЦІЙНОЇ ПРИДАТНОСТІ ДО СУПЕРПРОДУКЦІЇ ЛІЗИНУ

Дев'ять штамів *S. bovis* охарактеризовано з точки зору можливості їх використання для виробництва лізину. У безклітинних екстрактах цих штамів визначено активності аспараткінази та діамінопімелатдекарбоксілази, вміст лізину і діамінопімелату (ДАП). Показано, що ДАП-декарбоксілазна активність не корелює з рівнем виробництва лізину.

Вступ. Дослідження останніх років свідчать про зростаючий інтерес до використання амінокислот переважно у трьох сферах: у фармацевтичній і харчовій промисловості, а також у тваринництві. На сьогоднішній день найбільш перспективним й економічно вигідним засобом одержання багатьох амінокислот є мікробіологічний синтез. Серед продуктів мікробіологічного синтезу, які використовуються у тваринництві, частка незамінних амінокислот складає у теперішній час 13—16 %. Найбільш значні з них — лізин та треонін, додавання яких до корму сільськогосподарським тваринам у кількостях 3,8 і 1,8 кг/т відповідно забезпечує максимальну конверсію рослинного білка у тваринний [1]. Комерційна цінність лізину визначає інтерес до пошуку високоактивних штамів — продуцентів цієї амінокислоти в різних мікроорганізмів. Найбільш ефективними і такими, що вже більше 30 років застосовуються у промисловості як продуценти лізину, є коринеформні бактерії [2—4]. Перспективним об'єктом для великомасштабних процесів ферментативного отримання лізину є й бацили [5—7], які екскретують у середовище до 26 г/л цієї амінокислоти [8].

Проблема амінокислотного харчування сільськогосподарських тварин може бути вирішена не тільки за рахунок внесення амінокислот до раціонів годування, але й завдяки мікрофлорі їх шлунково-кишкового тракту. Особливо великою у цьому відношенні є роль мікроорганізмів рубця жуйних тварин. Використовуючи низькоякісну рослинну сировину, бактерії рубця здатні самостійно продукувати незамінні амінокислоти, у тому числі лізин. У зв'язку з цим ми провели тестування ряду штамів *S. bovis*, які перебувають на епітелії рубця, з метою виявлення найбільш придатних для виробництва лізину.

Матеріали і методи. У цій роботі використано 9 штамів *S. bovis*, отримані з колекції Ін-ту фізіології тварин (Кошице, ЧСФР) : 4-1, 44/9, 46/2, 47/3, 47/6, 59/2, 8В, ВМ114, АО24/85. Культивування бактерій провадили до пізньої логарифмічної фази росту при 37 °С у модифікованому нами середовищі Henderson and Snell наступного складу (г/л): глюкоза 20, цитрат натрію 20, K_2HPO_4 5, NH_4Cl 3, ацетат Na 1, $MgSO_4$ 0,1, гідролізат казеїну 0,1.

Бактеріальні клітини після відділення від культурального середовища центрифугуванням та промивання 0,15 М фосфатним буфером, рН 7,1, суспендували у буфері того ж складу та руйнували ультразву-

ком з частотою 20 кГц 3 рази по 30 с на установці MSE (Англія) у льодовій бані. Гомогенат центрифугували на протязі 1 год при 100000 g. Супернатант використовували як безклітинний екстракт.

Концентрації білка у безклітинних екстрактах досліджуваних культур визначали за допомогою методу [9]. Аспартаткіназу та ДАП-декарбоксилазу активність аналізували згідно рекомендаціям [10] і [11]. Вміст лізину та ДАП оцінювали за [12, 13].

Питому активність аспартаткінази визначали кількістю нмолей β -гідроксамату L-аспарагінової кислоти, яка утворюється за 1 хв і мг білка безклітинного екстракту, питому активність ДАП-декарбоксилази — кількістю мкмолей мезо-ДАП, декарбоксильованої за 1 хв і мг білка.

Результати і обговорення. Штами *S. bovis*, які були у нашому розпорядженні, піддавали комплексному аналізу для ідентифікації найбільш перспективних з точки зору виробництва лізину. У досліджуваних мікроорганізмів визначені активності ферментів, які каталізують першу і останню стадії утворення лізину, рівні накопичення клітинами цієї амінокислоти, а також її безпосереднього попередника — мезо-ДАП. Результати проведеного біохімічного аналізу наведено у таблиці.

Серед штамів, що аналізувалися, найвищий вміст лізину відзначено у 59/2, АО24/85, 44/9 і 47/3. Ці ж культури виявляють й найбільш високі рівні накопичення мезо-ДАП. Визначення ферментативних активностей не виявило істотних розбіжностей в рівнях синтезу ДАП-декарбоксилази у 59/2, АО24/85, 44/9 та 47/3. Проте активність аспартаткінази у 47/3 безумовно вища не тільки порівняно з 59/2, АО24/85, але й по відношенню до всіх досліджуваних стрептококів. Мабуть, ця обставина й визначає високий вміст мезо-ДАП у клітинах штаму 47/3. Проте кількість лізину, що накопичується 47/3, виявляється нижчою за той рівень, якого можна було сподіватися при наявності зазначеної концентрації мезо-ДАП у безклітинних екстрактах 47/3. Можливо, конверсія мезо-ДАП у лізин лімітується активністю ДАП-декарбоксилази.

Співставлення величин активності ДАП-декарбоксилази та рівнів накопичення лізину не дозволяє виявити кореляції між цими двома параметрами. Так, у безклітинних екстрактах штамів 4-1, 8В та 47/6 тестується однаковий вміст лізину, в той час як їх ДАП-декарбоксилазні активності різняться у 10 разів. Можливо, утворення мінімально необхідної для росту клітин кількості лізину забезпечується ~ 5 одиницями активності ДАП-декарбоксилази. Не знаходить пояснення факт, чому 40 одиниць активності ферменту дозволяють синтезувати як мінімально припустиму, так і у 5 разів більшу кількість лізину, особливо якщо взяти до уваги, що лізин у концентрації 2 мМ практично ціл-

Таблиця 1. *итому активність аспартаткінази, ДАП-декарбоксилази, вміст ДАП та лізину безклітинних екстрактах різних штамів S. bovis*

Штам	Активність ферментів		Концентрація	
	Аспартаткіназа, нмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	ДАП-декарбоксилаза, мкмоль·хв ⁻¹ ·мг ⁻¹ білка	ДАП, мкг/мл	Лізин, мкг/мл
4-1	1,02	3,7	41	22
44/9	2,20	49,0	199	107
46/2	2,22	15,8	74	45
47/3	3,69	43,1	199	63
47/6	0,86	40,0	46	20
59/2	1,92	30,9	190	95
8В	0,47	5,3	14	20
ВМ114	1,64	42,1	58	39
АО24/85	2,22	44,7	179	128

ком пригнічує ДАП-декарбоксилазну активність [14]. За таких умов рівень активності у 40 одиниць є значною мірою пригніченим.

Чималу роль у накопиченні лізину грає пул його безпосереднього попередника мезо-ДАП. За рівних ДАП-декарбоксилазних активностей більш високу концентрацію лізину тестували в тих безклітинних екстрактах, які містили більші кількості мезо-ДАП.

На засаді вищенаведеного можна зробити висновок, що останній етап утворення лізину у клітинах *S. bovis* контролюється складним регуляторним механізмом, з'ясування характеру якого потребує подальших досліджень.

Проведене тестування різних штамів *S. bovis* зупинило наш вибір на культурі АО24/85. Маючи добрі характеристики у плані ферментації лізину, АО24/85 виявляє високу α -амілазну активність, що вже дозволило використати даний штам у біотехнології [15].

Вміст лізину у клітинах АО24/85 також відрізняє даний штам серед інших організмів мікрофлори рубця [16], вказуючи на перспективність використання досліджуваної культури для забезпечення потреби жуйних тварин у лізину. Проте зазначений рівень накопичення лізину не дозволяє розглядати АО24/85 як можливий промисловий продуцент цієї амінокислоти.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Rees W. D., Flint H. J., Fuller M. F. A molecular biological approach to reducing dietary amino acid needs // J. Biotechnol.— 1990.— 8, N 7.— P. 629—633.
2. Nakayama K. Lysine // Comprehensive biotechnology.— New York: Pergamon press, 1985.— Vol. 3.— P. 607—620.
3. Pat. 3708395 USA. Process for producing L-lysine / K. Nakayama, K. Araki.— Publ. 1979.
4. Amino acids / A. Kleemann, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner // Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry.— Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft, 1985.— Vol. A2.— P. 57—97.
5. Chatterjee S. P., Banerjee A. K. Influence of B-vitamins on growth and extracellular lysine accumulation by *Bacillus megaterium* C1119 // Ind. J. Microbiol.— 1972.— 12, N 2.— P. 142—146.
6. Chatterjee M., Chatterjee S. P., Banerjee F. K. Dihydrodipicolinate synthase of lysine excreting and non excreting strains of *Bacillus megaterium* // J. acta biotechnol.— 1990.— 10, N 4.— P. 382—384.
7. Chaudhri A., Mishra A. K., Nanda G. Lysine excretion by S-(2-aminoethyl)-L-cysteine resistant mutants of *Bacillus subtilis* // Acta microbiol. pol.— 1983.— 32, N 1.— P. 37—45.
8. Chatterjee M., Chatterjee S. P., Banerjee F. K. Production of L-lysine by double auxotrophic and AEC resistant mutants of *Bacillus megaterium* // Res. and Ind.— 1990.— 35, N 2.— P. 133—137.
9. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // J. Anal. Biochem.— 1976.— 72, N 2.— P. 248—254.
10. Black S. Conversion of aspartic acid to homoserine // Meth. Enzymol.— 1962.— 5.— P. 820—832.
11. White P. J., Kelly B. Diaminopimelate decarboxylase (*E. coli*) // Ibid.— 1971.— 17, N 1.— P. 140—145.
12. Work E. Diaminopimelic acid // Ibid.— 1963.— 6, N 3.— P. 624—634.
13. Баздырева М. Н., Куцева Л. С. Спектрофотометрический метод определения лизина в культуральной жидкости *Brevibacterium 22* // Прикл. биохимия и микробиология.— 1974.— 10, № 5.— С. 756—760.
14. Kalcheva E. O., Faiziev M. M., Maluta S. S. The isolation and comparative analysis of diaminopimelate decarboxylases from *Streptococcus bovis* and *Bacillus subtilis* // Biochem. and Biotechnol. Electronic Express.— 1991.— 1, N 4.— P. 7—14.
15. Pouzitie kolonizacneho preparatu Amylastim v stimulacii bachoroveho typu travenia mladat prezuvavcov / V. Kmet, G. I. Kalachnyuk, S. Konik et al. // Veter. Med.— 1987.— 32, N, 5.— P. 705—709.
16. DAP-decarboxylase activity and lysine production by rumen bacteria / I. Styriak, E. O. Kalcheva, V. Kmet, S. S. Maljuta // Arch. Anim. Nutr.— 1991.— 38.— P. 317—323.

Ин-т молекуляр. біології і генетики АН України, Київ
Ин-т мікробіології АН Узбекистану, Ташкент
Ин-т фізіології тварин САН, Кошице, ЧСФР

Одержано 03.07.91