



УДК 575.1:576.851.5

Е. О. Кальчева, М. М. Файзиев, И. Штыряк, С. С. Малюта

СКРИНИНГ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ STREPTOCOCCUS BOVIS ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПРИГОДНОСТИ К СУПЕРПРОДУКЦИИ ЛИЗИНА

Девять штаммов S. bovis охарактеризованы с точки зрения возможности их использования для производства лизина. В бесклеточных экстрактах этих штаммов определены активности аспараткиназы и диаминопимелатдекарбоксилазы, содержание лизина и диаминопимелата (ДАП). Показано, что ДАП-декарбоксилазная активность не коррелирует с уровнем производства лизина.

Введение. Исследования последних лет свидетельствуют о возрастающем интересе к применению аминокислот преимущественно в трех сферах: в фармацевтической и пищевой промышленности, а также в животноводстве. На сегодняшний день самым перспективным и экономически выгодным способом получения многих аминокислот является микробиологический синтез. Среди продуктов микробиологического синтеза, используемых в животноводстве, доля незаменимых аминокислот составляет в настоящее время 13—16%. Наиболее значимы из них — лизин и треонин, добавка которых в корм сельскохозяйственным животным в количествах 3,8 и 1,8 кг/т соответственно обеспечивает максимальную конверсию растительного белка в животный [1]. Коммерческая ценность лизина определяет интерес к поиску высокоактивных штаммов — продуцентов этой аминокислоты у различных микроорганизмов. Наиболее эффективными и уже более 30 лет применяемыми в промышленности продуцентами лизина являются коринеформные бактерии [2—4]. Перспективным объектом для крупномасштабных процессов ферментативного получения лизина выступают и бактерии [5—7], экскретирующие в среду до 26 г/л этой аминокислоты [8].

Проблема аминокислотного питания сельскохозяйственных животных может быть решена не только за счет внесения аминокислот в рационы кормления, но также благодаря микрофлоре их желудочно-кишечного тракта. Особенно велика в этом отношении роль микроорганизмов рубца жвачных животных. Используя низкокачественное растительное сырье, бактерии рубца способны самостоятельно продуцировать незаменимые аминокислоты, в том числе и лизин. В связи с этим мы провели тестирование ряда штаммов *S. bovis*, обитающих на эпителии рубца, с целью выявления наиболее пригодных для производства лизина.

Материалы и методы. В настоящей работе использованы 9 штаммов *S. bovis*, полученные из коллекции Ин-та физиологии животных (Кошице, ЧСФР): 4-1, 44/9, 46/2, 47/3, 47/6, 59/2, 8В, ВМ114, АО24/85. Культивирование бактерий проводили до поздней логарифмической фазы роста при 37 °С в модифицированной нами среде Henderson and Snell следующего состава (г/л): глюкоза 20, цитрат натрия 20, K_2HPO_4 5, NH_4Cl 3, ацетат Na 1, $MgSO_4$ 0,1, гидролизат казеина 0,1.

Бактериальные клетки после отделения от культуральной среды центрифугированием и промывки 0,15 М фосфатным буфером, pH 7,1,

© Е. О. КАЛЬЧЕВА, М. М. ФАЙЗИЕВ, И. ШТЫРЯК, С. С. МАЛЮТА, 1992

супендировали в буфере того же состава и разрушали ультразвуком с частотой 20 кГц 3 раза по 30 с на установке MSE (Англия) в ледяной бане. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 100 000 g. Супернатант использовали в качестве бесклеточного экстракта.

Концентрации белка в бесклеточных экстрактах исследуемых культур определяли с помощью метода [9]. Аспараткиназную и ДАП-декарбоксилазную активности анализировали согласно рекомендациям [10] и [11]. Содержание лизина и ДАП оценивали по [12, 13].

Удельную активность аспараткиназы определяли количеством нмоль β -гидроксамата *L*-аспарагиновой кислоты, образующихся за 1 мин 1 мг белка бесклеточного экстракта, удельную активность ДАП-декарбоксилазы — количеством мкмоль мезо-ДАП, декарбоксилированной за 1 мин 1 мг белка.

Результаты и обсуждение. Имевшиеся в нашем распоряжении штаммы *S. bovis* были подвергнуты комплексному анализу для идентификации наиболее перспективных с точки зрения производства лизина. У исследуемых микроорганизмов определены активности ферментов, катализирующих первую и последнюю стадии образования лизина, уровни накопления клетками этой аминокислоты, а также ее непосредственного предшественника — мезо-ДАП. Результаты проведенного биохимического анализа представлены в таблице.

Среди анализируемых штаммов наивысшее содержание лизина отмечено у 59/2, А024/85, 44/9 и 47/3. Эти же культуры показывают и наиболее высокие уровни накопления мезо-ДАП. Определение ферментативных активностей не выявило существенных различий в уровнях синтеза ДАП-декарбоксилазы у 59/2, А024/85, 44/9 и 47/3. Активность же аспараткиназы у 47/3 безусловно выше не только в сравнении с 59/2, А024/85, но и по отношению ко всем исследуемым стрептококкам. Видимо это обстоятельство и определяет высокое содержание мезо-ДАП в клетках штамма 47/3. Однако количество лизина, накапливаемого 47/3, оказывается ниже того уровня, который можно было ожидать при наличии указанной концентрации мезо-ДАП в бесклеточных экстрактах 47/3. Вероятно, конверсия мезо-ДАП в лизин лимитируется активностью ДАП-декарбоксилазы.

Сопоставление величин активности ДАП-декарбоксилазы и уровня накопления лизина не позволяет обнаружить корреляции между двумя этими параметрами. Так, в бесклеточных экстрактах штаммов 4-1, 8В и 47/6 тестируется одинаковое содержание лизина, в то время как их ДАП-декарбоксилазные активности различаются в 10 раз. По-видимому, образование минимально необходимого для роста клеток количества лизина обеспечивается ~5 единицами активности ДАП-декарбоксилазы. Не находит объяснения факт, почему 40 единиц активности фермента позволяют синтезировать как минимально допустимое, так и в 5 раз большее количество лизина, особенно если принимать во внимание, что лизин в концентрации 2 мМ практически полностью инги-

Удельная активность аспараткиназы, ДАП-декарбоксилазы, содержание ДАП и лизина в бесклеточных экстрактах различных штаммов *S. bovis*

Штамм	Активность ферментов		Концентрация	
	Аспараткиназа, нмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	ДАП-декарбоксилаза, мкмоль·мин ⁻¹ ·мг ⁻¹ белка	ДАП, мкг/мл	Лизин, 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	68
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
А024/85	2,22	44,7	179	128

бирует ДАП-декарбоксилазную активность [14]. В таких условиях уровень активности 40 единиц является в значительной степени подавленным.

Немаловажную роль в накоплении лизина играет пул его непосредственного предшественника мезо-ДАП. При равных ДАП-декарбоксилазных активностях более высокая концентрация лизина тестируется в тех бесклеточных экстрактах, которые содержат большие количества мезо-ДАП.

На основании вышеизложенного можно заключить, что последний этап образования лизина в клетках *S. bovis* контролируется сложным регуляторным механизмом, выяснение характера которого требует дальнейших исследований.

Проведенное тестирование различных штаммов *S. bovis* остановило наш выбор на культуре АО24/85. Имея хорошие характеристики в плане ферментации лизина, АО24/85 проявляет высокую α -амилазную активность, что уже позволило использовать данный штамм в биотехнологических целях [15].

Содержание лизина в клетках АО24/85 также выделяет данный штамм из числа других организмов микрофлоры рубца [16], указывая на перспективность использования исследуемой культуры для обеспечения потребности жвачных животных в лизине. Однако отмеченный уровень накопления лизина не позволяет рассматривать АО24/85 в качестве возможного промышленного продуцента этой аминокислоты.

Резюме. Девять штамів *S. bovis* охарактеризовано з точки зору можливості їх використання для виробництва лізину. У безклітинних екстрактах цих штамів визначено активності аспартаткінази та діамінопімелатдекарбоксилази, вміст лізину і діамінопімелату (ДАП). Показано, що ДАП-декарбоксилазна активність не корелює з рівнем виробництва лізину.

Summary. Nine strains of *Streptococcus bovis* were characterized from the point of view of the potentially ability to produce lysine. The specific activities of aspartate kinase and diaminopimelate decarboxylase, lysine and diaminopimelate contents were assayed in extracts of these strains. It was shown that diaminopimelate decarboxylase activity did not correlate with the lysine production.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ress W. D., Flint H. J., Fuellr 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. Chaudhuri A., Mishra A. K., Nanda G. Lysine excretion by *S*-(2-aminoethyl)*L*-cysteine resistant mutants of *Bacillus subtilis* // Acata microbiol. pol.— 1983.— 32, N 1.— P. 37—45.
8. Chatterjee M., Chaterjee 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 portein-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. Použitie kolonizačného preparátu Amylastim v stimulácii bachorového typu trávenia mládat prezúvavcov / 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. биологии и генетики АН Украины, Киев
 Ин-т микробиологии АН УзССР, Ташкент
 Ин-т физиологии животных САН, Кошице, ЧСАР

Получено 03.07.91

УДК 577.2.08+579.254.2

М. Ф. Алексеев, Н. В. Гуньковская

МЕТОД БЫСТРОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ И НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ

Описаны две модификации метода замораживания-оттаивания для трансформации энтеробактерий: стандартная и упрощенная. Первая позволяет в течение 1 ч трансформировать *Escherichia coli* IM109 и *Klebsiella oxytoca* VN13 с эффективностью до $2,5 \cdot 10^6$ трансформантов на 1 мкг ДНК. Вторая дает возможность за 5 мин трансформировать эти штаммы с эффективностью $1 \cdot 10^6$ трансформантов на 1 мкг ДНК. Модификации были успешно использованы для трансформации *Enterobacter cloacae* CCM1902, *E. aerogenes* CCM2531 и *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ИМВ8351.

Введение. Трансформация энтеробактерий плазмидной ДНК является обычной процедурой в молекулярном клонировании. Однако относительно низкая трансформируемость природных штаммов *Klebsiella* [1, 2] и других энтеробактерий является причиной того, что в эти организмы, как правило, вводятся готовые генноинженерные конструкции. При такой организации экспериментов фактор времени играет большую роль и, следовательно, проблема разработки быстрых, но достаточно эффективных методов введения плазмидной ДНК в энтеробактерии является актуальной. Стандартные процедуры, используемые для приготовления компетентных клеток *Klebsiella* и других энтеробактерий (обычно для этих целей используется метод, разработанный Cohen [3], и его модификации), занимают много времени. При этом способы длительного хранения компетентных клеток бактерий, отличных от *Escherichia coli*, разработаны слабо. Более того, обычно нет необходимости (или возможности) хранить препараты компетентных клеток всех штаммов, с которыми работают в лаборатории. Недавно Merrick et al. [4] опубликовали модифицированный метод замораживания — оттаивания для трансформации *E. coli* и *Klebsiella*. Несмотря на довольно высокую эффективность этого метода (до $7 \cdot 10^6$ трансформантов на 1 мкг ДНК для *K. aerogenes*), он включает в себя довольно длительные этапы «разгонки» ночной культуры (2 ч) и инкубации клеток после оттаивания (2—4 ч). Мы предлагаем две модификации этого метода: стандартную и упрощенную. Последняя исключает использование обеих этих стадий и позволяет в течение 5 мин произвести трансформацию

© М. Ф. АЛЕКСЕЕВ, Н. В. ГУНЬКОВСКАЯ, 1992