

З. В. Маршавина, В. А. Газарян, В. А. Аракелова

Использование мочевины для микробиологического получения L-лизина

Лизин (α , ϵ -диаминокапроновая кислота) является важной аминокислотой и занимает особое положение в азотистом обмене организмов. Незначительные добавки лизина к рационам сельскохозяйственных животных дают заметный экономический эффект.

Известно несколько способов получения L-лизина. Наиболее эффективным пока является микробиологический способ его получения, путем ферментации в виде биологически активной L-формы, полностью усваиваемой организмом животного. Из продуцентов лизина наиболее перспективными являются гомосеринзависимые мутанты *Micrococcus glutamicus* (Патент США, 1961), а также треонинзависимый мутант *Brevibacterium* 22.

Культура *M. glutamicus* при биосинтезе лизина лучше использует в качестве источника азота соли аммония. Имеются, однако, некоторые сведения об использовании этой культурой также и мочевины (Зайцева, 1966).

Целью настоящей работы явилось выяснение оптимальных концентраций мочевины для ферментации, режимов ее стерилизации, влияния дробных добавок и использования мочевины совместно с хлористым аммонием.

Объекты и методы

В качестве продуцента лизина использовался *M. glutamicus* штамм 95. Опыты по изучению влияния мочевины на биосинтез лизина проводились на двух средах: синтетической (I) и ферментационной (II), где минеральный азот был заменен различными концентрациями мочевины (0,3; 0,5; 1,0; 1,6; 2,0; 3,0; 5,0%).

Состав сред (%)

I	II
Глюкоза—10	Меласса—20,0
$K_2 HPO_4$ —0,01	Кукурузный экстракт—3,0
$KH_2 PO_4$ —0,03	$CaCO_3$ —2,0
$MgSO_4$ —0,03	
$CaCO_3$ —2	
Треонин—1000 г/мл	
Метионин—400 г/мл	
Биотин—20 г/л	

Ферментация проводилась в колбах Эрленмейера (250 мл) при $t=27-28^\circ C$, на качалке при 220 об/мин. Для лучшей аэрации в колбы наливалось по 10 мл среды; ферментация длилась 72 часа. По окончании ферментации измерялся pH—потенциометрически, титр клеток—нефелометрически, количество лизина—хроматографически, с последующим калориметрированием. Опыт проводился в 6 повторностях, в качестве контроля использовалась среда с NH_4Cl —3%.

Результаты опытов

При изучении методов стерилизации мочевины были выбраны следующие режимы: холодная стерилизация фильтром Зейца и автоклавирование мочевины отдельно от других солей среды и совместно с ними при 0,5 атм.—20 мин и 0,4 атм.—10 мин. В опыте испытывались следующие концентрации мочевины: 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2%. Данные опыта приведены в табл. 1. Как видно из данных табл. 1, при стерилизации мочевины отдельно от солей питательной среды способ стерилизации не оказывает существенного влияния на выход лизина, в то время как при совместной стерилизации мочевины с солями среды биосинтез лизина резко снижается.

С целью отработки оптимальных условий использования мочевины для ферментации L-лизина были испытаны следующие ее концентрации: 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 5,0%. Опыты проводились на двух средах: синтетической (I) и ферментационной (II). Результаты опыта (табл. 2) показали, что 0,5%-ная мочевина была наиболее благоприятной для

Таблица 1

Влияние различного режима стерилизации мочевины на биосинтез лизина (учет данных на 72-й час ферментации, титр клеток—млрд/мл, лизин—г/л)

Мочевина, %	Режим стерилизации	pH	Титр клеток	Лизин
0,3	0,4 атм. 10 мин.	6,0	7,8	8,2
0,5		6,0	8,7	20,2
1,0		6,3	7,5	13,4
1,5		8,0	2,7	10,1
2,0		8,0	2,7	9,3
0,3	0,5 атм.	6,0	6,8	10,1
0,5		6,0	8,2	19,8
1,0		7,0	6,9	12,8
1,5		8,0	3,0	11,8
2,0		8,0	2,7	11,3
0,5	Фильтр Зейца	6,0	8,2	21,4
1,0		7,0	7,9	18,9
0,5		6,5	1,5	5,3
	Вместе с солями 0,5 атм. 20 мин.			
Контроль NH ₄ Cl		6,0	8,8	24,6

Таблица 2

Влияние мочевины на биосинтез лизина на синтетической среде (72-й час ферментации, титр клеток—млрд/мл, лизин—г/л)

Мочевина, %	pH	Титр клеток	Лизин	остаточная глюкоза, %
0,3	5,6	7,8	12,4	2,0
0,5	5,8	7,9	14,4	1,7
1,0	5,8	7,7	12,9	3,0
1,5	6,0	5,3	9,1	3,0
2,0	6,0	5,1	8,9	3,0
3,0	6,0	5,2	8,2	3,8
5,0	8,0	2,4	следы	8,1
NH ₄ Cl—3% контроль	6,0	7,9	18,9	1,1

лучшего выхода лизина на синтетической среде. Повышение концентрации мочевины в среде до 3% снижало интенсивность нарастания биомассы и биосинтез лизина. 5%-ная концентрация мочевины вызвала резкое падение титра клеток и биосинтеза лизина. Большие концентрации мочевины изменили также направленность биосинтеза и в среде появились другие аминокислоты. Динамика биосинтеза лизина в зависимости от концентрации мочевины в среде показана на рис. 1.

Подобная же закономерность наблюдалась и на ферментационной среде. Высокая концентрация мочевины тормозила нарастание биомассы и резко снижала выход лизина. Резуль-

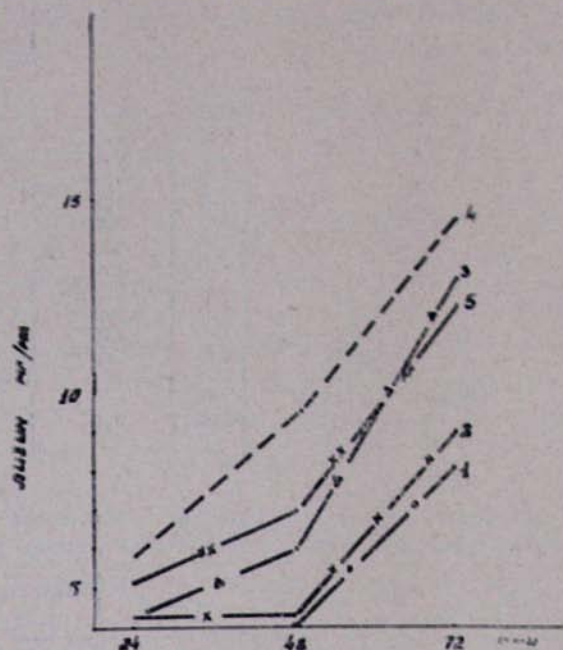


Рис. 1. Влияние мочевины (%) на биосинтез лизина

1 — мочевины—3
2 — — — — — 2
3 — — — — — 1

4 — мочевины—0,5
5 — — — — — 0,3

таты опыта по изучению влияния различных концентраций мочевины на выход лизина на ферментационной среде представлены в табл. 3.

Таблица 3
Влияние мочевины на биосинтез лизина на ферментационной среде (учет на 72-м часу ферментации, лизин—г/л, количество клеток—млрд/мл)

Мочевина, %	Титр клеток	Лизин
0,5	11,8	13,5
1,0	8,1	7,0
3,0	4,4	6,4
5,0	1,5	следи
NH ₄ Cl—3%	8,8	12,8

С целью изучения возможности комплексного использования органического и минерального азота для ферментации лизина нами был проведен опыт с различными соотношениями мочевины и NH_4Cl . Расчет производился по азоту NH_4Cl . Контролем служили: синтетическая среда с NH_4Cl —3% и с мочевиной—0,5%, в качестве единственного источника азота.

Результаты опыта (табл. 4) показали определенную зависимость между биосинтезом лизина и различными соотношениями источников азота. Так, выход лизина при равном соотношении органического и неорганического азота был несколько выше, чем в контрольных вариантах. Однако наряду с лизином довольно интенсивно шло образование глютаминовой кислоты.

В варианте, где хлористый аммоний составлял 75% общего азота среды, титр клеток к концу ферментации был достаточно низким и не превышал $2,5 \times 10^9$, биосинтез лизина оставался в пределах 5—6 мг/мл. При этом усиливался синтез других аминокислот, в частности глютаминовой кислоты и аланина.

Наибольший выход лизина был получен при использовании 1%-го раствора мочевины и 0,7%-ного— NH_4Cl .

В варианте, где концентрация мочевины составляла 0,5%, а NH_4Cl —1,5%, выход лизина, по сравнению с другими вариантами опыта, был достаточно высокий.

Таблица 4

Влияние мочевины и хлористого аммония на биосинтез лизина на синтетической среде

(учет на 72-м часу ферментации, лизин г/л, количество клеток млрд/мл.)

Источник азота	%	Титр клеток	Лизин	РН
NH_4Cl	3	3,0	7,5	6,5
Мочевина	0,5	2,8	7,0	6,3
NH_4Cl	1,5			
мочевина	0,5	3,5	13,0	5,8
	1,5	3,5	10,0	6,2
"	0,7			
	0,7	3,5	13,8	6,2
"	1,0			
	2,2	2,3	5,3	6,2
"	0,3			

Как видно из результатов опыта с комплексным использованием хлористого аммония и мочевины, различные соотношения указанных источников азота оказывают заметное влияние как на биосинтез лизина, так и на направленность азотистого обмена.

Опыты с дробными добавками мочевины не дали положительных результатов, более того, по сравнению с контролем, во всех вариантах дробных добавок выход был ниже.

Выводы

1. Установлена полная возможность замены аммонийного источника азота мочевиной при ферментации L-лизина культурой *Micrococcus glutamicus* 95.

2. Мочевина в концентрации 0,5% обеспечивает максимальный уровень биосинтеза лизина культурой *M. glutamicus* 95.

3. При стерилизации мочевины отдельно от солей среды способ стерилизации не оказывает заметного влияния на биосинтез лизина.

4. При использовании мочевины в комплексе с хлористым аммонием наиболее благоприятным для биосинтеза лизина было соотношение 3:1.

Չ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Վ. Ա. ԳԱԶԱՐՅԱՆ, Վ. Ա. ԱՌԱԿԵԼՈՎԱ

Լ-ԼԻԶԻՆԻ ՄԻԿՐՈՐԹԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՍՏԱՑՈՒՄԸ ՄԻԶԱՆՅՈՒԹԻ
ՕԳՏԱԳՈՐԾՄԱՄԲ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Դրսից բերվող հումքի փոխարեն տեղական աղբյուրների օգտագործման նպատակով ուսումնասիրվել է միզանյութի օգտագործման հնարավորությունները Լ-լիզինի ստացման համար ներկա աշխատության նպատակն է եղել պարզել միզանյութի օպտիմալ քանակությունը, միզանյութի և NH_4Cl -ի համատեղ օգտագործման հնարավորությունը, ինչպես նաև միզանյութի ախտահանման կարգը:

Ուսումնասիրության արդյունքներից պարզվել է, որ սննդամիջավայրում միանգամայն հնարավոր է օգտագործել միզանյութը:

իրեն ազոտի աղբյուր, և որ նրա 0,5%-ը կարող է ապահովել *Micrococcus glutamicus* 95-ի կողմից լիզինի բիոսինթեզի առավելագույն քանակի ստացումը: Պարզվել է նաև, որ միզանյութի և NH_4Cl -ի համատեղ օգտագործման դեպքում անհրաժեշտ է այն վերցնել 3 : 1 հարաբերությամբ:

Միզանյութի առանձին ախտահանումը, ինչպես նաև տխուհանման ձևեր լիզինի բիոսինթեզի վրա ոչ մի ազդեցություն չի դրոշում:

Z. B. Marshavina, V. A. Gazarian, V. A. Arakelova

The use of urea for the microbiological production of L-lysine

Summary

The possibility of using urea in the fermentation of L-lysine has been studied. We were faced, in the present examination, with the task of establishing the maximum concentrations of urea, the possibility of using urea and ammonium chloride together and a study of the sterilization conditions of urea. The full possibility of substituting the ammonium source for nitrogen as urea has been established. 0,5% concentration of urea provides the maximum level of lysine biosynthesis with a culture of *M. glutamicus* 95. The ratio 3:1 proved most favourable in using urea with NH_4Cl . The method of sterilizing urea does not influence the biosynthesis of lysine when sterilizing the former separately from the salts of the medium.

ЛИТЕРАТУРА

- Патент США № 2979439, 1961. Одноступенчатый способ ферментации L-лизина.
Зайцева З. М. 1966. Влияние различных компонентов среды на метаболизм культуры *Micrococcus glutamicus* 95 продуцента лизина. «Прикладная биохимия и микробиология», 2, 5, 519.