

В. А. Унянյан, И. Я. Хачатурова, Л. А. Чил-Акопян

Изучение условий поддержания и репродукции культур—продуцентов L-лизина

Получение L-лизина с помощью микроорганизмов требует выяснения оптимальных условий поддержания активности культур-продуцентов.

В настоящее время для сохранения микроорганизмов широко используются методы лиофилизации и хранения их под вазелиновым маслом (Пумпянская, 1964; Harrison, Pelczar, 1963; Quevillon, Benoit, Panisset, 1963; Martin, 1964; Герольд, 1966; Кузнецов, 1966). Изучение жизнеспособности бактерий показало надежность этих методов хранения для большинства микроорганизмов. Однако нам не удалось в литературе найти сведений об условиях поддержания и репродукции культур-продуцентов лизина.

Объекты и методы

Исследования проводились на двух мутантах—*Micrococcus glutamicus* шт. 95 и 95-1, дефицитных по гомосерину или метионину и треонину со стимуляцией роста в присутствии биотина. Около года культуры хранились без пересева при разных температурных режимах (+4°C и +12°C) под вазелиновым маслом и без него на следующих агаризованных питательных средах: пептонный агар—ПА, мясопептонный агар—МПА (из сухого питательного агара), агаризованная среда Хоттингера с содержанием 50, 100 и 200 мг% аминокислот азота (аминокислотный азот определялся методом формольного титрования).

Использовалась также синтетическая среда (СС), обычно применяемая для ферментации лизина (состав в %: глюкоза—10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —2,0; K_2HPO_4 —0,1; KH_2PO_4 —0,03; MgSO_4 —0,03; треонин—1000 г/мл; метионин—400 г/мл; биотин—20 г/л; pH=7,0—7,3), а также синтетическая среда, где био-

тин и аминокислоты были заменены дрожжевым автолизатом с 20 мг% аминного азота. Дрожжевой автолизат, по треонину и метионину, добавлялся с таким расчетом, чтобы его количество приблизительно было равным содержанию в среде Хоттингера.

Для хранения культур без вазелинового масла посев производился штрихом на обычно скошенную в пробирках среду, а для хранения под вазелиновым маслом—на слабоскошенную среду. Через пять суток инкубации при 27—28°C культуры на слабоскошенном агаре заливались стерильным вазелиновым маслом на 0,5 см выше верхнего края косяка (Пумпянская, 1964).

После 1—1,5-годичного хранения культуры проверялись на активность биосинтеза лизина. В контроле использованы культуры, пересеваемые каждые 2—3 месяца и хранившиеся на среде Хоттингера со 100 мг% аминного азота при +4°C.

Ферментация для изучения биосинтеза лизина проводилась на двух средах—синтетической (СС) с 2% CaCO_3 и на среде с мелассой (СМ) в процентах: меласса—20,0; кукурузный экстракт—2,0; NH_4Cl —1,5; CaCO_3 —2,0; pH —7,0—7,3. В качестве посевной среды в этом случае бралась ферментационная среда с меньшим содержанием мелассы (в процентах): меласса—2,0; кукурузный экстракт—3,0; NaCl —2,0.

Культуры с исходных сред высевались на косяки со средой Хоттингера (100 мг% аминного азота). Суточные культуры, выращенные при 27—30°C, использовались для получения посевного материала. Последний готовился в пробирках диаметром 15 мм на жидких средах—синтетической и на среде с мелассой. После суточной инкубации на качалке (240—260 об/мин) при температуре 27—28°C посевной материал в количестве 5—8% от ферментационной среды переносился соответственно в СС и СМ.

Для наблюдения за изменением pH в процессе ферментации в синтетическую среду добавляли фенолрот до конечной концентрации 1:1000. Реакция среды выравнивалась с помощью 20%-ного раствора NaOH . Ферментация проводилась в течение трех суток в колбах Эрленмейера, емкостью 250 мл с 10 мл среды на качалке (240—260 об/мин) при температуре

27—30°. По окончании ферментации проверялись: рН—потенциометрически или индикаторными бумажками, количество клеток—нефелометрически, L-лизин—методом восходящей бумажной хроматографии. Разделение аминокислот проводилось однократно в системе бутанол: уксусная кислота: вода—(4:1:5) при +20+25°C. Учитывались также характер роста и культуральные особенности штаммов, хранившихся в разных условиях.

Обсуждение результатов

Биосинтез лизина различался у штаммов, хранившихся в разных условиях. Эти различия проявлялись неодинаково при ферментации на испытанных средах. Так, в большинстве случаев на среде СМ отмечалось более интенсивное лизинообразование, чем на среде СС (табл. 1 и 2). Однако более четкая разница в биосинтезе лизина между разными вариантами выявлялась при ферментации на среде СС.

Сравнение данных по биосинтезу лизина при хранении культур-продуцентов под вазелиновым маслом и без него показало, что условия хранения в последнем случае были более благоприятными. Длительное хранение культур без пересевов под вазелиновым маслом в основном снижало продуктивность штаммов.

Температура хранения культур в какой-то мере также отражалась на их активности. Так, мутант 95-1 лучше сохранял активность биосинтеза лизина при хранении его при +12°C. Однако нам не удалось отметить определенную закономерность в активности биосинтеза лизина у мутанта 95 при разных температурных режимах.

Более четкие результаты по изменению биосинтетических особенностей изучаемых штаммов получены под действием состава сред, на которых они сохранялись. Наименее пригодной средой для хранения культур оказался ПА, где даже в случае умеренного или хорошего роста культуры были нежизнеспособными и не пересевались. То же самое происходило и с культурами, хранившимися под вазелиновым маслом. При хранении штамма 95 на МПА без вазелинового масла свойство лизи-

Таблица 1

Влияние на биосинтез лизина различных условий поддержания штамма 95 (данные через 72 часа ферментации; титр клеток—млрд/мл; лизин—г/л)

Среды, на которых поддерживались культуры	Температура хранения (+°C)	Ферментация на среде синтетической (СС)				Ферментация на среде с мелассой (СМ)			
		культуры под вазелиновым маслом		культуры без масла		культуры под вазелиновым маслом		культуры без масла	
		титр клеток	лизин	титр клеток	лизин	титр клеток	лизин	титр клеток	лизин
МПА	4	При пересеве рост отсутствовал	—	16,9	12,3	При пересеве рост отсутствовал	—	16,8	15,8
	12	—	—	18,0	11,5	—	—	6,9	15,1
Хоттингера с 50 мг% аминного азота	4	5,5	2,0	6,5	8,0	15,1	10,2	14,7	16,0
	12	6,2	7,0	4,8	11,0	14,2	13,0	8,0	13,3
Хоттингера со 100 мг% аминного азота	4	9,5	5,0	17,8	11,0	15,3	13,0	14,7	16,0
	12	—	—	16,0	13,5	14,1	1,5	8,0	14,0
Хоттингера с 200 мг% аминного азота	4	6,5	7,0	11,5	10,7	15,5	16,0	8,2	17,0
	12	3,2	6,0	17,0	14,3	14,3	15,0	8,5	15,0
Синтетическая, с треонином, метионином, биотином	4	5,4	7,0	9,0	12,5	14,0	13,0	8,5	12,5
	12	6,1	13,0	4,0	9,0	13,8	16,0	8,2	10,1
Синтетическая, с дрожжевым автолизатом	4	6,2	7,0	—	—	14,1	13,0	17,8	18,2
	12	8,5	16,0	При пересеве рост отсутствовал	—	14,5	19,0	При пересеве рост отсутствовал	—
Контроль—среда Хоттингера с 100 мг% аминного азота	4	9,3	16,0	14,9	11,3	15,8	20,0	15	19,5

Таблица 2

Влияние на биосинтез лизина различных условий поддержания штамма 95-1

(данные через 72 часа ферментации; титр клеток—млрд/мл, лизин—г/г)

Среды, на которых поддерживались культуры	Температура хранения (°C)	Ферментация на среде синтетической (СС)				Ферментация на среде с мелассой (СМ)			
		культуры под вазелиновым маслом		культуры без масла		культуры под вазелиновым маслом		культуры без масла	
		титр клеток	лизин	титр клеток	лизин	титр клеток	лизин	титр клеток	лизин
МПА	4	4,5	6,3	2,0	0,6	11,8	14,3	12,0	14,5
	12	При пересеве рост отсутствовал		9,5	7,5	При пересеве рост отсутствовал		9,8	9,0
Хоттингера с 50 мг % аминокислот азота	4	4,2	5,1	4,5	1,0	11,3	13,7	14	16,5
	12	При пересеве рост отсутствовал		8,5	10,0	12,8	12,0	10,0	13,0
Хоттингера с 100 мг % аминокислот азота	4	4,2	5,2	9,0	3,5	10,1	10,2	13,8	16,7
	12	12,8	14,5	10,0	15,5	12,0	12,5	10,0	13,5
Хоттингера с 200 мг % аминокислот азота	4	3,7	3,9	6,5	9,5	11,8	13,0	14,0	17,0
	12	13,1	15,8	10,1	14,0	13,4	16,0	10,2	16,0
Синтетическая с треонином, метионином, биотином	4	8,4	13,7	4,7	11,1	10,0	8,0	13,0	16,5
	12	13,2	18,0	11,2	19,0	13,2	15,5	12,3	17,5
Синтетическая с дрожжевым автолизатом	4	9,5	14,2	8,5	13,7	14,0	18,2	15,0	19,0
	12	13,6	19,5	14,1	21,5	13,5	18,0	12,0	19,0
Контроль—среда Хоттингера с 100 мг % аминокислот азота	4	9,4	19,0	9,4	19,0	15,2	21,0	15,2	22,5

нообразования сохранилось и было близким к контролю, тогда как у штамма 95-1 выход лизина несколько снижался. При хранении штаммов на агаре Хоттингера с различными концентрациями аминного азота (50, 100, 200 мг%) заметных колебаний в изменении уровня биосинтеза лизина не наблюдалось.

Для хранения обоих штаммов наиболее благоприятными средами оказались СС с биотином и аминокислотами и СС с дрожжевым автолизатом. Следует, однако, отметить, что длительное хранение штамма 95 на среде СС с дрожжевым автолизатом без вазелинового масла привело к потере жизнеспособности культуры. Сравнение биосинтетической активности длительно хранившихся штаммов с контролем, пересеваемым каждые 2—3 месяца, показало значительное преимущество частых пересевов.

Учитывая разницу между контрольными и опытными вариантами, можно получить, по-видимому, более высокую продуктивность культур при частых перeseвах их на СС с аминокислотами и биотином и СС с дрожжевым автолизатом.

Наряду с изучением биосинтетических особенностей длительно хранившихся культур, нами были изучены их культуральные особенности, которые в основном обуславливались составом среды. Так, на ПА рост был слабый или умеренный, цвет колоний—желтый со слабым блеском; на МПА—рост обильный (без вазелинового масла) и хороший (под вазелиновым маслом), цвет колоний—бежевый; при +4°C отмечался слабый влажный блеск, а при 12°C—масловидный.

На среде Хоттингера с низкой концентрацией аминного азота рост был хороший, при средней и высокой концентрации—обильный. В зависимости от концентрации аминного азота менялся цвет колоний—от кремового к бежевому, а поверхность колоний—от крупинчатой к бугорчатой. Блеск колоний бывал то слабый, то вовсе отсутствовал (матовые колонии).

На СС с добавками рост культур в основном был обильным. Цвет колоний колебался от кремового до бежевого; поверхность от крупинчатой до бугристой, чаще с сильным блеском.

Штаммы контрольных вариантов отличались хорошим ростом, кремоватыми гладкими колониями со слабым блеском.

Следует отметить, что в большинстве случаев между ростом культур и интенсивностью лизинообразования наблюдалась корреляция. Однако имелись и исключения. Так, культура 95-1, поддерживавшаяся на синтетической среде с дрожжевым автолизатом под вазелиновым маслом при $t+4^{\circ}\text{C}$, при умеренном росте интенсивно образовала лизин.

На МПА и среде Хоттингера с 200 мг% аминного азота наблюдалась сильная пигментация, которая на продуктивности культур не отразилась.

Проделанная работа позволяет сделать следующие предварительные выводы:

1. Состав среды является одним из основных факторов, влияющих на сохранение мутантами *Micrococcus glutamicus* биосинтетической активности. Из испытанных сред наиболее благоприятными оказались СС с метионином, треонином, биотином и та же среда с дрожжевым автолизатом.

2. При длительном хранении изученных мутантов свойство лизинообразования несколько лучше сохраняется в условиях без вазелинового масла.

3. Длительное хранение культур (1—1,5 года) без пересевов неблагоприятно сказывается на их биосинтетической активности.

Վ. Ա. ՀՈՒԱՆՅԱՆ, Ի. ՅԱ. ԿԱԶԱՏՈՐՈՎԱ, Լ. Ա. ՉԻՆՎԱՌՅԱՆ

1-ԼԻԶԻՆԻ ՍԻՆԹԵԶՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱԼ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՄԱՆ ՈՒ ՎԵՐԱՐՏԱԳՐՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

1-լիզինի սինթեզող կուլտուրաների (*Micrococcus glutamicus* 95 և 95—1) բիոսինթետիկ առանձնահատկությունների պահպանման նպատակով ուսումնասիրվել է 1-լիզինի բիոսինթեզի և մուտանտների պահպանման պայմանների՝ ջերմային ռեժիմի, սննդամիջավայրերի կազմության, վաղելիության շուրջ բացակայությամբ ու նրա առկայությամբ կուլտուրաները պահելու տևողության միջև եղած կախումը:

Ցույց է տրված, որ բիոսինթետիկ ակտիվության վրա ազդող

հիմնական գործոններից մեկը սննդամիջավայրերի կազմութունն է: Շտամների արդյունավետութունն ավելի լավ է պահպանվել սինթետիկ սննդամիջավայրում, որին ավելացվել է մի դեպքում մեթիոնին, տրեոնին, բիոտին, իսկ մի այլ դեպքում՝ շաքարասընկային ավտոլիզատ:

Լիզին առաջացնելու հատկությունը փոքր ինչ ավելի լավ է պահպանվում վաղեկինային յուղի բուցակայության պայմաններում:

Կուլտուրաները առանց վերացանքի երկար ժամանակ (1—1,5 տարի) պահելը անբարենպաստ է նրանց բիոսինթետիկ ակտիվության վրա:

Լիզինի բիոսինթետիկ մակարդակի փոփոխության մեջ, կուլտուրայի պահպանման ջերմաստիճանից (4 և 12 աստիճան) կախված, պարզորոշ օրինաչափություններ չեն նշվել:

V. A. Hunanian, I. Ya. Khachaturova, L. A. Chil-Hakopian

A study of conditions required for the conservation of 1-lysine producers

Summary

To preserve the biosynthetic characteristics of the producers of 1-lysine (*M. glutamicus* strains 95 and 95—1) we studied the relationship between the biosynthetic level of the lysine producer and the conditions required to conserve the mutants: the temperature range, the composition of the medium, the duration of conservation with and without vaseline oil.

It has been proved that one of the basic factors influencing the biosynthetic activity is the composition of the medium used. Strain productivity was better preserved on a synthetic medium to which methionine, threonine and biotin or yeast extract were added.

The property of lysine production is better preserved when the cultures are kept without vaseline oil.

The conservation of cultures over a long period (1—1.5 years) without transfers affects their lysine biosynthetic activity unfavourably.

No distinct relationship between the differences of lysine biosynthetic levels and the conservation temperatures (4° and 12°) has been observed.

ЛИТЕРАТУРА

- Герольд М. 1966. «Антибиотики».
- Кузнецов В. Д. 1966. Хранение актиномицетов. «Антибиотики», № 6, 574.
- Пумтянская Л. В. 1964. Хранение микроорганизмов под минеральным маслом. «Микробиология», 33, 6, 1065.
- Harrison A. F., P., Pelczar M. J. 1963. Damage and survival of bacteria during freeze-drying and during storage over a ten year period. J. Gen. Microbiol., 30, 3, 395.
- Martin S. M. 1964. Conservation of microorganisms. Annual Rev. Microbiol., 18, 1.
- Ouevillon M., Benoit J. C., Panisset M. 1963. Etude quantitative de la viabilité des bactéries avant et après liophilisation. Mise au point d'une méthode d'appréciation. Rev. canad. biol., 22, 3—4, 447.