

З. В. Маршавина, С. Г. Асланян

Условия подготовки посевного материала *Micrococcus glutamicus* 95 для получения l-лизина

В литературе почти отсутствуют данные по изучению условий подготовки посевного материала и последующего влияния состояния посевного материала на биосинтез лизина (Шевчик, Лишка, Гошек, 1965). Между тем, возможности укорочения продолжительности ферментации могут быть связаны именно с работами в этом направлении. Потенциальные возможности микроорганизмов, в частности *M. glutamicus* 95, в стадии подготовки посевного материала могут обеспечивать различный уровень биосинтеза лизина при ферментации.

С этой целью нами были начаты работы по изучению влияния состава среды, температуры и продолжительности инкубации на физиологическое состояние культуры *M. glutamicus* 95 в стадии подготовки посевного материала. Изучалось также влияние количества и возраста посевного материала на биосинтез лизина и некоторые морфо-физиологические изменения клеток *M. glutamicus* 95 по ходу ферментации.

Материалы и методы

В качестве объекта испытывался *M. glutamicus* 95. Подготовка посевного материала проводилась на средах (в %): синтетической (CC)—глюкоза—10,0, NH_4Cl —3,0, K_2HPO_4 —0,1, KH_2PO_4 —0,03, MgSO_4 —0,03, CaCO_3 —2,0, D1—треонин—1000 γ /мл, D1—метионин—400 γ /мл, биотин—20 γ /л и на среде с мелассой (CM)—меласса—4,0, кукурузный экстракт—1,0, NaCl —2,0.

Суточная культура с косяков (среда Хоттингера, 100 мг% аминного азота) выращивалась в пробирках на качалках в течение 4, 8, 16, 24, 48 часов при температурах 27, 30—31, 37°.

Затем $2-2,5 \times 10^8$ клеток с посевной средой переносились в 10 мл среды для проведения ферментации.

Указанное количество клеток выбрано опытным путем и было достаточным для обеспечения оптимальной ферментации. Основная ферментация проводилась на двух средах: синтетической (состав указан выше) и на среде с мелассой (в %): меласса—15,0, кукурузный экстракт—2,0, NH_4Cl —1,5, CaCO_3 —2,0. Опыты проводились в Эрленмейеровых колбах (250 мл) с 10 мл среды при $t=30^\circ\text{C}$, на качалке 220 об/мин, в течение 72 часов. Мел, глюкоза, аминокислоты и биотин стерилизовались отдельно от солей. Компановка сред проводилась непосредственно перед ферментацией. Кислотность среды определялась потенциометром, титр клеток—нефелометрически, количество лизина—с помощью хроматографического разделения на бумаге в системе бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5) с последующим калориметрированием.

Опыты проводились по четырем основным вариантам.

Посевной материал, выращенный на синтетической среде с 4, 8, 16, 24-часовой инкубацией, при $t^\circ=27, 30-31$ и 37°C использовался в ферментации: на синтетической среде (СС), на среде с мелассой (СМ).

Посевной материал, выращенный на среде СМ с различной продолжительностью инкубации и температурами, использовался для ферментации также на синтетической среде (СС) и на среде с мелассой (СМ).

С целью изучения некоторых морфо-физиологических особенностей *M. glutamicus* 95 нами для ферментации были выбраны следующие среды: синтетическая с мелассой и синтетическая, где источником азота служила мочевина—0,4% и NH_4Cl —2,25%. Через каждые 3,5 часов ферментации в стерильно отобранных пробах определялись следующие показатели: размер и форма клеток, окраска по Граму, окраска жиров и нуклеонидов, кислотность среды, титр клеток и количество лизина. Окраску жиров проводили суданом 3 с предварительной фиксацией препарата в парах формалина. Для окраски нуклеонидов блок агар с культурой фиксировался сначала парами 2% раствора осмия, затем в Карнуа. После гидролиза

в HCl препарат красился толуидином голубым и докрашивался 0,025% сафранином.

Результаты опытов

Получение сравнимых результатов достигалось внесением одинакового количества посевного материала в ферментационные среды ($2-2,5 \times 10^9$ клеток на 10 мл среды). При различной продолжительности инкубации посевного материала указанное количество клеток соответствовало разному объему посевной среды. Так, при инкубации 4 часа на среде СС $2,5 \times 10^9$ клеток содержалось в 3,5 мл посевной среды. С увеличением сроков инкубации объем посевного материала соответственно уменьшался (в мл):

при 8-часовой инкубации на среде СС—2,0

» 16-	»	инкубации	»	СС—1,0
» 24	»	»	»	—0,4
» 48	»	»	»	—0,4
» 4	»	»	»	СМ—2,5
» 8	»	»	»	—1,5
» 16	»	»	»	—0,9
» 24	»	»	»	—0,4
» 48	»	»	»	—0,2

Изучение влияния различных температур, продолжительности инкубации и состава сред при подготовке посевного материала на рост биомассы и биосинтез лизина *M. glutamicus* 95 показало, что обуславливающими факторами являются температура и состав среды. Следует отметить, что при проведении ферментации большое значение имеет также состав среды.

Так, в варианте I (табл. 1 и рис. 1), где посевной материал готовился на синтетической среде при $t=27^\circ$ и был использован для ферментации на синтетической среде независимо от продолжительности инкубации отмечен слабый рост клеток ($1-3 \times 10^9$) и низкий выход лизина ($6-10$ мг/мл).

Во втором варианте, где ферментация велась на среде (СМ) с посевным материалом, приготовленным на синтетической среде, был получен достаточно высокий титр клеток ($9-10 \times 10^9$). Следует отметить также, что при инкубации по-

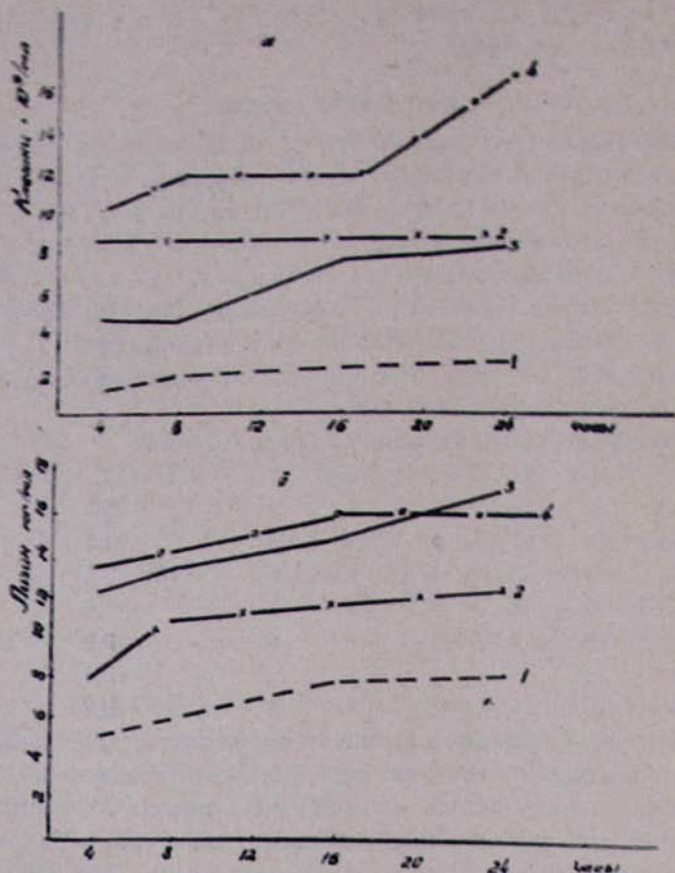


Рис. 1. Влияние температуры (27°C) и продолжительности инкубации на рост и биосинтез лизина *M. glutamicus* 95. а—рост биомассы, б—лизин.

- 1—посевная среда СС, ферментационная—СС
 2— " " СС, " " —СМ
 3— " " СМ, " " —СС
 4— " " СМ, " " —СМ

севного материала в течение 4, 8, 16, 24 и 48 часов потенциальная возможность для дальнейшего роста клеток сохранялась во всех вариантах и обеспечивала получение высокого титра клеток к концу ферментации. Продолжительность инку-

бации посевного материала, не оказав влияния на конечный титр клеток, заметно отразилась на биосинтезе лизина. Наблюдалась прямая зависимость между продолжительностью инкубации посевного материала и выходом лизина.

В опыте, где подготовка посевного материала велась на среде с мелассой и кукурузным экстрактом, а ферментация проводилась на синтетической среде (вариант 3) титр клеток и количество лизина находились в зависимости от продолжительности инкубации посевного материала. Можно отметить также, что в варианте 3 при сравнительно низком титре клеток наблюдался достаточно высокий выход лизина (табл. 1).

Таблица 1

Биосинтез лизина с подготовкой посевного материала при 27°C
(учет данных на 72-м часу ферментации)

Вариант* опыта	Срок инкубации посевного материала в часах	pH	Количество клеток, млрд/мл	Лизин, мг/мл
1	4	7,2	1,2	6,3
2		6,3	8,5	10,5
3		5,8	4,8	16,0
4		6,8	10,0	17,6
1	8	6,5	1,8	7,1
2		6,3	9,0	14,3
3		5,9	5,1	17,6
4		6,5	11,7	17,6
1	16	6,2	2,5	10,3
2		6,7	8,9	16,0
3		5,3	8,0	10,0
4		6,5	12,0	21,3
1	24	6,8	2,5	10,7
2		6,5	9,0	17,0
3		4,5	8,2	23,4
4		6,0	16,8	22,2
1	48	6,2	3,2	10,7
2		6,8	10,0	20,0
3		4,8	8,5	23,8
4		6,2	15,2	23,4

* Варианты опыта приведены в тексте, в разделе „Материалы и методы“.

Высокий титр клеток и количество лизина отмечены в опыте, где подготовка посевного материала и последующая ферментация велись на среде с мелассой (вариант 4). В этом случае с увеличением продолжительности инкубации посевного материала заметно увеличивался титр клеток и количество лизина.

Как показывают данные (табл. 2 и рис. 2), повышение температуры с 27 до 30—31°C при подготовке посевного материала существенной разницы в биосинтезе лизина и нараста-

Таблица 2
Биосинтез лизина с подготовкой посевного материала при 30—31°C
(учет данных на 72-м часу ферментации)

Вариант опыта	Срок инкубации посевного материала в часах	pH	Количество клеток, млрд/мл	Лизин, мг/мл
1	4	7.8	2.5	8.4
2		8.1	6.9	18.0
3		5.4	6.7	13.7
4		6.2	11.6	22.0
1	8	6.0	2.5	6.3
2		8.1	9.0	13.0
3		5.1	5.1	6.3
4		7.5	10.1	21.0
1	16	7.4	2.4	8.1
2		8.2	8.5	16.0
3		5.3	4.4	21.0
4		6.9	10.5	22.2
1	24	5.8	2.4	6.3
2		8.4	8.4	14.3
3		6.2	10.8	20.1
4		6.5	14.8	21.0
1	48	6.9	3.2	9.0
2		7.8	7.6	10.1
3		4.9	5.7	13.0
4		6.6	13.2	20.0

нии биомассы не дало. Не получилось заметного различия также и в вариантах с различной продолжительностью инкубации посевного материала.

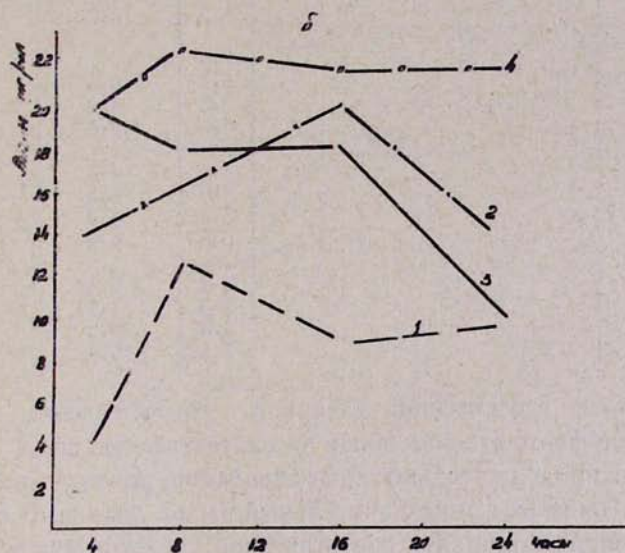
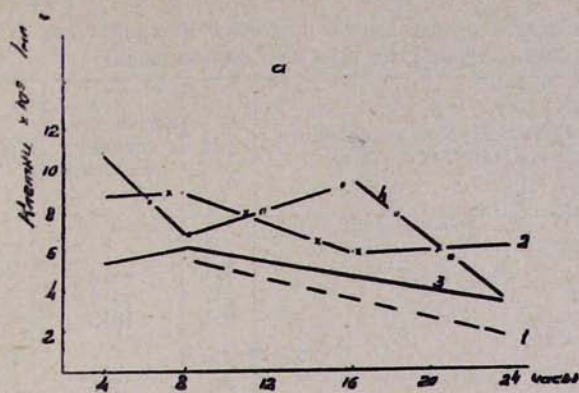


Рис. 2. Влияние температуры (30—31°C) и продолжительности инкубации на рост и биосинтез лизина *M. glutamicus* 95. а—рост биомассы, б—лизин

1—посевная среда—СС, ферментационная—СС

2- CC, —C.M

3— CM, —CC

4— " CM, " —CM

Данные, полученные при проведении ферментаций, посевной материал для которых готовился при 37°, приведены в табл. 3 и на рис. 3.

Таблица 3

Биосинтез лизина с подготовкой посевного материала при 37°C
(учет данных на 72-м часу ферментации)

Вариант опыта	Срок инкубации посевного материала в часах	pH	Количество клеток, млрд/мл	Лизин, мг/мл
1	4	7.0	—	5.1
2		8.1	8.2	19.2
3		6.2	5.5	26.4
4		6.1	10.5	26.1
1	8	6.0	5.7	16.0
2		7.5	8.5	21.1
3		5.1	5.1	23.4
4		5.2	6.2	28.0
1	16	7.5	—	11.7
2		5.8	6.3	26.0
3		5.5	4.4	24.1
4		5.9	9.5	28.2
1	24	6.5	1.5	11.7
2		8.0	6.3	18.0
3		5.3	3.3	10.2
4		6.5	3.6	28.1
1	48	6.0	6.0	17.4
2		5.5	6.9	23.4
3		5.0	6.3	23.5
4		5.5	9.0	28.2

В опыте, где посевной материал с синтетической среды поступал в ферментацию также на синтетическую среду, независимо от продолжительности ферментации, получен наименьший рост биомассы и незначительный выход лизина. В опыте, где посевной материал с синтетической среды переносился в ферментацию на среду СМ, получен значительно лучший рост биомассы и, соответственно, более высокий биосинтез лизина, причем, наилучшей продолжительностью инкубации посевного материала при этом было 16 часов. Наилучшие результаты получены в опыте по схеме со среды СМ на ферментацию на среде СМ. В данном случае самый высокий титр клеток и выход лизина (28 мг/мл) отмечен при оптимальной продолжительности инкубации—8—16 часов.

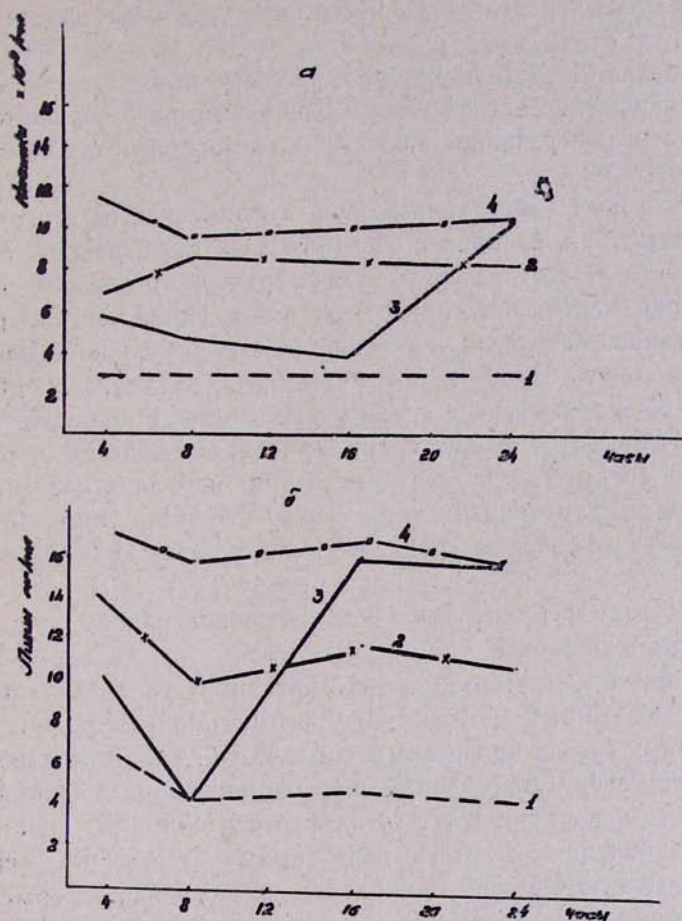


Рис. 3. Влияние температуры (37° С) и продолжительности инкубации на рост и биосинтез лизина *M. glutamicus* 95. а—рост биомассы, б—лизин.

- | | | | | |
|----|----------------|-----|-----------------|-----|
| 1— | посевная среда | СС, | ферментационная | СС |
| 2— | " | СС, | " | СМ |
| 3— | " | СМ, | " | СС |
| 4— | " | СМ, | " | СМ. |

Морфо-физиологические изменения клеток по ходу ферментации

Изучение динамики биохимических изменений культуры по ходу ферментации 1-лизина даст возможность разрабо-

тать методы контроля активности культур и хода ферментации.

Клетки *M. glutamicus* 95 обычно овальные, эллипсоидные, чаще парные, но встречаются и одиночные; размеры клеток в среднем в поперечнике—1,02—1,2 μ , в продольном направлении—1,4—1,9 μ .

По ходу ферментации размер и форма клеток несколько меняются. Так, начиная с 36—48-го часа ферментации, в зависимости от состава среды и температурного режима ферментации, клетки несколько удлиняются. Например, на среде с мочевиной переход к удлинению клеток несколько задерживается (после 59 часов ферментации). Культура *M. glutamicus* 95 в первые двое суток ферментации грамположительна, а затем—грамотрицательна, причем, это зависит от pH и состава среды. Так, на синтетической и на среде с мелассой переход в грамотрицательную форму наступает после 48 часов ферментации, на среде с мочевиной—к концу третьих суток.

По ходу ферментации в клетках окрашивались жир, нуклеоиды и оболочка.

Данные некоторых морфо-цитохимических изменений клеток *M. glutamicus* 95 по ходу ферментации на разных питательных средах приведены в табл. 4, 5, 6. Так, если в исходной клетке внутриклеточный жир окрашивается в виде 1—2 зерен, то к концу третьих суток ферментации он занимает больше половины клетки в виде нескольких крупных зерен. На среде с мочевиной наблюдалось уменьшение содержания внутриклеточного жира.

При окраске на нуклеоиды в цитоплазме обнаруживаются округлые структуры, лежащие у одного из полюсов клетки. К концу ферментации количество их уменьшается, они бледнее окрашиваются и, таким образом, становятся менее заметными.

Оболочка клеток, по нашим данным, по ходу ферментации, не претерпевает заметных изменений.

Таблица 4

Цитохимические изменения клеток *M. glutamicus* 95 по ходу ферментации на синтетической среде

Продолжительность ферментации в часах	Форма клеток	Окраска по Граму	Внутриклеточный жир (число зерен)	Нуклеониды
Перед ферментацией	Эллипсоидные, яйцевидные	+	1—2	Крупный нуклеонид, расположенный у полюса клетки
12	"	+	1—2	"
24	"	++	1—2	"
29	"	++	2—3	"
36	"	++	2—3	"
48	Удлиненные	—	3—5	Слабо окрашены
59	"	—	5—6	"
71	"	—	Мелкие зерна слились в одно крупное	Плохо заметны
76	"	—	Занимает половину клетки	"

Таблица 5.

Цитохимические изменения клеток *M. glutamicus* 95 по ходу ферментации на среде с мелассой

Продолжительность ферментации в часах	Форма клеток	Окраска по Граму	Внутриклеточный жир (число зерен)	Нуклеониды
Перед ферментацией	Эллипсоидные, яйцевидные	+	1—2	Крупный нуклеонид у полюса клетки
12	"	+	1—2	"
24	"	++	3—4	"
29	"	++	3—4	"
36	Чуть удлиненные	+	3—4	"
48	Удлиненные	—	Зерна очень крупные	Заметно уменьшился и плохо окрашивается
59	"	—	"	"
71	"	—	"	"
76	"	—	Жир занимает больше половины клетки	"

Таблица 6

Цитохимические изменения клеток *M. glutamicus* 95 по ходу ферментации на синтетической среде с мочевиной

Продолжительность ферментации в часах	Форма клеток	Окраска по Граму	Внутриклеточный жир (число зерен)	Нуклеониды
Перед ферментацией	Эллипсоидные	++	1-2	Крупный нуклеонид
12	"	++	1-2	" "
24	"	++	1-2	" "
29	"	++	1-2	" "
36	"	+	3-4	" "
48	Несколько удлинённые	+	3-4	" "
59	"	—	Зерна крупные	" "
71	"	—	"	" "
76	Удлиненные	—	"	Плохо окрашивается, еле заметен

Проведенные эксперименты позволяют сделать некоторые предварительные выводы:

1. Интенсивность биосинтеза лизина и роста биомассы *Micrococcus glutamicus* 95 в значительной степени определяется составом среды, температурой, количеством и возрастом посевного материала.

2. Максимальный выход лизина (28 мг/мл) наблюдается в варианте, где подготовка посевного материала и ферментация велись на среде с мелассой и кукурузным экстрактом.

3. Подготовка посевного материала и проведение ферментации на синтетической среде показало наиболее низкий выход лизина.

4. Цитохимические исследования клеток по ходу ферментации не выявили четких показателей для использования их на индикацию биосинтеза лизина.

Զ. Վ. ՄԱՐՇԱՎԻՆԱ, Ս. Գ. ԱՍԼԱՆՅԱՆ

Micrococcus glutamicus—95-ԻՑ
ԼԻԶԻՆ ՍՏԱՆԱԼՈՒ ՀԱՄԱՐ ՑԱՆՔԻ ՆՅՈՒԹ ՊԱՏՐԱՍՏԵԼՈՒ
ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

M. glutamicus 95 շտամի կողմից սինթեզվող լիզինի ֆերմենտացիայի ժամկետը կրճատելու հնարավորությունը բացահայտելու նպատակով ուսումնասիրվել են սննդանյութի կազմը, ջերմաստիճանի ուժիմը, ինկուբացիայի տևողությունը, ինչպես նաև բակտերիայի բջիջների մորֆո-ֆիզիոլոգիական մի շարք փոփոխությունները ֆերմենտացիայի ընթացքում:

Պարզվեց, որ ցանքի նյութը ջերմություն 37°C -ում պատրաստելու ժամանակ կարճանում է նրա ինկուբացիայի տևողությունը և ապահովվում է բջիջների բարձր տիտրը ու ֆերմենտացիայի ժամանակ լիզինի բարձր ելքը:

Լիզինի առավելագույն ելք (28 մգ/մլ) ստացվում է *M. glutamicus* 95-ը եփպտացորենի մզվածքի և շաքարատահանք (մեկաս) պարունակող սննդանյութի մեջ աճեցնելու դեպքում: Ֆերմենտացիայի ընթացքում բջիջների մորֆո-ցիտոքիմիական ուսումնասիրությունները պարզ ցուցանիշներ չեն տվել, որով հնարավոր լինելու լիզինի բիոսինթեզը որոշել:

Z. V. Marshavina, S. T. Aslanian

Conditions for the preparation of inoculum of *Micrococcus glutamicus* 95 for l-lysine fermentation

S u m m a r y

The conditions for the preparation of inoculum were studied with a view to finding out the possibility of reducing the fermentation time of l-lysine of *M. glutamicus*; the composition of the medium, temperature, duration of incubation, as well as a number of morpho-physiological changes of cells in the course of fermentation. It became evident that the preparation of inoculum at 37° reduced the duration of incubation and provided for a high titre of cells and a yield of lysine in fermentation. The maximum yield of lysine (28 mg/ml) was derived while

preparing the inoculum in a fermentation medium with melasses and maize extract. Morpho-cytochemical investigations of cells during fermentation have failed to reveal distinct features that might be used to indicate the biosynthesis of lysine.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевчик Ф., Лишка Б., Гошек Б. 1965. „Микробиологический синтез“, 8, 13—14.