

З.В.Маршавина, С.Г.Асланян

БИОСИНТЕЗ ЛИЗИНА MICROCOCCUS GLUTAMICUS ШТ.95 ПРИ  
РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ПОДГОТОВКИ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Микроорганизмы широко используются в настоящее время в промышленности для получения практически важных биологически-активных веществ /ферменты, антибиотики, токсины, витамины, аминокислоты и др./. Микробиологические процессы такого рода или ферментации существенно отличаются от бродильных, предназначенных для получения продуктов энергетического обмена — спирты, орг. кислоты, ацетон /Рубан 1968; Иерусалимский 1963/, и определяются в производственных условиях следующими факторами: качеством посевного материала, составом культуральной среды и условиями выращивания микроорганизма — температура, скорость размешивания, количество подаваемого воздуха и т.п. Самым непостоянным из перечисленных факторов является качество посевного материала, зависящее от численности микроорганизмов, их жизнеспособности и возраста /Штернберг, Журица, 1960/.

О значении посевной культуры микроорганизмов в процессах брожения писал еще Пастер, наблюдая прямую зависимость скорости деления и развития дочерних клеток от условий, в которых выращивались материнские дрожжи (Пастер, 1937). Вопрос о значении качества посевного материала с теоретических позиций был поставлен Шапошниковым. Им отмечалось, что при подготовке посевной культуры необходимо руководствоваться ее физиологическим состоянием. Знание возрастной морфо-физиологической изменчивости микробных культур может привести к созданию оптимальных условий для микробиологических процессов /Шапошников, 1939/.

Имеется достаточно много работ (Henrici, 1928; Winslow, Walker, 1939), указывающих на морфо-физиологические различия старых и молодых культур. При этом возрастные изменения, кроме прочих условий, вызываются накоплением продуктов жизнедеятельности или истощением субстрата. Известно, что при пересевах из материнской культуры отсевы начинают свое развитие с той же стадии, которую они проходили в материнской культуре (Hiller, 1895/

Возраст материнской культуры, как отмечено в ряде ра-

отот, оказывает большое влияние на скорость размножения бактерий и, особенно, в отсевах первых двух генераций. В отсевах из старой культуры, как это было показано работами Канунниковой /1945, 1947/, не только ослабевает темп размножения, но и в большей степени снижается скорость прироста бактериальной массы. Размеры клеток при этом тем меньше, чем старше посевной материал. Таким образом, накопление бактериальной массы, также как и биохимическая активность, находится в зависимости от возраста исходной культуры, от ее физиологического состояния. Изучение особенностей развития микроорганизмов, поэтому, позволит установить определенные закономерности их биосинтетической активности и сделать обоснованными рекомендации для производственного процесса.

Известно, что синтез аминокислот микроорганизмами, также как и других продуктов, связан с биологической активностью используемого посевного материала, с возрастом культуры и условиями их предварительного выращивания (Гривинь, 1968; Маршавина, Асланян, 1969; Кептярёва, 1966; Озолин, 1964; Патент США, 1958/.

Есть все основания полагать, что выявление эффективных методов репродукции и подготовки посевного материала для ферментации одной из важных незаменимых аминокислот — лизина, даст возможность для интенсификации и укорочения процесса лизинообразования.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния условий подготовки посевной культуры *M. glutamicus* шт.95 (состав среды, продолжительность инкубации, пересевы и т.п.) на биосинтез лизина при ферментациях на различных питательных средах. Проработан также и вопрос об оптимальном количестве посевного материала, необходимого для ферментации.

#### Материалы и методы

В работе использовался гомосерин-недостаточный мутант *Micrococcus glutamicus* шт.95, полученный из лаборатории селекции и генетики Института атомной энергии им.И.В.Курчатова. Культуру выращивали в течение суток на косяках рыбного агара при 30°. Клетки смывали физиологическим раствором и полученной

суспензией заражали посевные среды /Юмл/ для получения посевного материала.

Составы использованных питательных сред представлены в таблице I.

Посевной материал готовился на средах I-II в зависимости от условий опыта: ферментации проводились на средах IФ, 5Ф, 9Ф, 10Ф, IIФ. Порядковый номер ферментационных сред соответствует номеру посевных сред, несколько модифицированных для ферментаций.

Изучение влияния продолжительности инкубации посевного материала, полученного на различных средах, на биосинтез лизина проводилось на 16-ти и 24-х часовых культурах.

Инкубация посевного материала велась при 30° и 37°. Дальнейшая ферментация проводилась в колбах Эрленмейера (250мл) на качалке (220-240 об/мин) при 30° в течение 72 часов на двух средах - IФ, 5Ф.

С целью активизации культуры был испытан ступенчатый метод ее подготовки. Он заключался в том, что сначала в течение 16-18 часов посевную культуру инкубировали на одной среде (первичной) а затем определенное количество клеток *M. glutamicus* (2,5-2 x 10<sup>9</sup>) переносили во вторую среду того же или другого состава (вторичная посевная) для продолжения инкубирования в течение последующих 16-18 часов.

Подготовленная таким образом на разных комбинациях питательных сред (I, 5, 9, 10, II) посевная культура использовалась для ферментации на различных средах (I, 5, 9, 10, II-Ф).

Компоненты среды стерилизовались отдельно. Компановка сред проводилась непосредственно перед ферментацией. Кислотность среды проверялась универсальным индикатором, титр клеток - нефелометрически, количество лизина - с помощью хроматографического разделения на бумаге в системе бутанол-уксусная кислота - вода (4:1:5) с последующим колориметрированием.

Для опытов со ступенчатой подготовкой посевного материала в качестве контроля использовался посевной материал, полученный одноступенчато, т.е. на одной из испытуемых первичных сред с последующей ферментацией на пяти изучаемых ферментационных средах



Продолжение таблицы I

|                                         |      |      |      |      |     |     |
|-----------------------------------------|------|------|------|------|-----|-----|
| DL-треонин, мг/мл                       | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0  | 1,0 | 1,0 |
| DL-метионин, мг/мл                      | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4  | 0,4 | 0,4 |
| Гиббереллов.к-та /А <sub>3</sub> /мг/мл |      |      |      | 0,4  |     |     |
| Биотин мкг/г                            | 20,0 | 20,0 | 20,0 | 20,0 |     |     |
| Ср.Хоттингера, мг/г                     |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>12</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>6</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>1</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>2</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>3</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>4</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>5</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>7</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>8</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>9</sub> мкг/г                |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>10</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>11</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>13</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>14</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>15</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>16</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>17</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>18</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>19</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>20</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>21</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>22</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>23</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>24</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>25</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>26</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>27</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>28</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>29</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>30</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>31</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>32</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>33</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>34</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>35</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>36</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>37</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>38</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>39</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>40</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>41</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>42</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>43</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>44</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>45</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>46</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>47</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>48</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>49</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>50</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>51</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>52</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>53</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>54</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>55</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>56</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>57</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>58</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>59</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>60</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>61</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>62</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>63</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>64</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>65</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>66</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>67</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>68</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>69</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>70</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>71</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>72</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>73</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>74</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>75</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>76</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>77</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>78</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>79</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>80</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>81</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>82</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>83</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>84</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>85</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>86</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>87</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>88</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>89</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>90</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>91</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>92</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>93</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>94</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>95</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>96</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>97</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>98</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>99</sub> мкг/г               |      |      |      |      |     |     |
| Вит.В <sub>100</sub> мкг/г              |      |      |      |      |     |     |

рН - для всех сред - 7-7,5. Тв.альбумин гидролизовался 6N HCl , 8 часов, 1 ат.

Тирозинат казеина (pankreatisch) Made in Germany.

### Результаты опытов

Поскольку вопрос о количестве вносимых клеток посевной культуры в ферментацию недостаточно проработан, были поставлены опыты по изучению влияния количества посевных клеток, выращенных на разных питательных средах и температурных режимах, на биосинтез лизина. В колбы с 10 мл ферментационной среды вносили от 10 тыс. до 10 млрд. посевных клеток с интервалами в 10 тысяч. Внесение разного количества клеток с косяка в посевные среды оказывает незначительное влияние на интенсивность роста посевной культуры; нарастание биомассы зависит в основном от состава питательной среды. На более богатых средах внесение густой суспензии оказывает стимулирующее влияние на конечный титр клеток в посевной культуре.

Замена кукурузного экстракта на гидролизат творожного альбумина (по треолину 500-1000 мкг/мл) в среде с мелассой положительно сказалась на титре клеток в посевном материале.

Анализ данных показал, что для получения оптимального титра посевной культуры достаточно внести 0,5-1,0  $\times 10^9$  кл/мл с косяка.

Изучение влияния различных условий подготовки посевной культуры на биосинтез лизина проводилось при ферментации на двух вариантах сред 1Ф, 5Ф. Изучалась также зависимость между процессом лизинообразования и количеством внесенного посевного материала в ферментацию ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^{10}$  кл. на 10 мл среды).

В опыте, где посевной материал готовился на среде I при температуре 30°, биосинтез лизина зависел от состава среды, на которой проводилась ферментация и от количества внесенного посевного материала. Данные, представленные на рис. I, показывают, что внесение 100 тыс. посевных клеток в 10 мл ферментационной среды обеспечивало наибольший уровень биосинтеза лизина (34 г/л) при ферментации на синтетической среде (1Ф). Проведение ферментации на среде с мелассой (5Ф) с использованием полученного аналогичным способом посевного материала, приводи-

ло к резкому падению биосинтеза лизина, и лишь внесение большого количества посевного материала с 24-х часовой инкубацией несколько интенсифицировало процесс образования лизина. Продолжительность инкубации посевного материала в оптимальных условиях опыта не имела существенного значения.

При подготовке посевного материала на среде I повышение температуры до  $37^{\circ}$  вызывало резкое угнетение лизинообразования при ферментации на среде IФ, тогда как на среде 5Ф этот процесс был достаточно интенсивен (рис.1б).

Использование синтетической среды, обогащенной дрожжевым автолизатом (I $\frac{1}{2}$ ) для подготовки посевной культуры, обеспечивало в некоторых вариантах опыта довольно высокий выход лизина (рис.2). Так, проведение ферментации на среде IФ с внесением посевного материала от I млн. до I млрд. кл. на 10 мл среды выход лизина составлял до 40-50 г/л. При этом не наблюдалось большой разницы в уровне биосинтеза от использования посевного материала с различной продолжительностью инкубации. 16-ти часовая посевная культура обеспечивала высокий выход лизина. Этот же посевной материал, использованный в ферментации на среде 5Ф, показал заметное снижение уровня лизинообразования, но также не зависел от продолжительности инкубации посевной культуры.

Данные опыта с посевным материалом, подготовленным на среде с дрожжевым автолизатом при температуре  $37^{\circ}$ , представлен на рис.2б. В этом случае при ферментации на синтетической среде интенсивность процесса лизинообразования несколько была снижена, а на среде 5Ф получена стимуляция этого процесса. Как и в предыдущих опытах, выход лизина не зависел от продолжительности инкубации посевного материала. 16-ти часовая культура по своему физиологическому состоянию полностью обеспечивала высокий уровень лизинообразования.

На рис.3 представлены данные по биосинтезу лизина в ферментациях, где использовался посевной материал, подготовленный на синтетической среде с добавлением гидролизата казеина 400 мкг/мл при температуре  $30^{\circ}$ . При ферментации на синтетической

среде (IФ) подобный посевной материал, независимо от продолжительности его инкубации, обеспечивал выход лизина не более 20–23 г/л при внесении его от 1 млн. до 10 млн. клеток на 10 мл среды. Подобная закономерность наблюдалась и при ферментации на среде 5Ф. Повышение температуры до 37° (рис.3б) привело к полной потере свойства лизинообразования у продуцента в ферментациях на среде IФ и не оказывало отрицательного действия на ферментацию со средой 5Ф.

Поскольку успешное решение вопроса стимуляции процесса лизинообразования может иметь большое практическое значение, нами была сделана попытка проверить действие гиббереллина, как сильного формообразовательного фактора на посевную культуру и последующее его влияние на размножение *M. glutamicus* и биосинтез лизина. В среду, на которой готовился посевной материал, добавлялась гибберелловая кислота  $A_3-400$  мкг/мл и затем после 16-ти и 24-х часовой инкубации проводилась ферментация на средах IФ и 5Ф. Как показывают данные (рис.4), мы не получили стимулирующего влияния гиббереллина ни на энергию размножения культуры, ни на биосинтез лизина. Наоборот, обнаруживалась даже некоторая тенденция к его снижению.

При ферментации на среде 5Ф, где достаточно, по-видимому, ростовых факторов, не наблюдалось действия гиббереллина вообще. Добавка гиббереллина в среду для ферментации спустя 40–48 часов, несколько ускоряла процесс лизинообразования по сравнению с контролем и, таким образом, укорачивала срок ферментации.

Использование среды Хоттингера для подготовки посевного материала и дальнейшего проведения ферментации на синтетической среде показало, что более высокий уровень биосинтеза лизина (до 24 г/л) обеспечивался внесением большого числа посевных клеток, инкубированных в течение 24-х часов (рис.5).

Подготовка посевного материала при повышенной температуре (37°) отрицательно сказалась как на росте клеток, так и на биосинтезе лизина при ферментации на среде IФ и не повлияла на эти показатели в ферментации на среде 5Ф.

На рис.6 представлены данные по биосинтезу лизина, полученные в ферментациях на средах IФ и 5Ф с посевным материалом,

подготовленным на среде 5. Посевная культура, полученная таким образом на синтетической среде, независимо от сроков инкубации, несколько тормозила рост клеток и процесс лизинообразования, тогда как на среде 5Ф титр клеток, также как и количество лизина, были достаточно высокими.

Повышение температуры до  $37^{\circ}$  в момент подготовки посевного материала на среде 5Ф (рис. 6б) и дальнейшее использование его в ферментации как на синтетике, так и на среде 5Ф, хотя и обеспечивало оптимальный титр клеток, однако уровень биосинтеза лизина был довольно низким.

В связи с проведением нами работ по изучению возможностей использования гидролизатов творожного альбумина взамен кукурузного экстракта в ферментации лизина, мы испытали их также и в качестве компонента среды при подготовке посевного материала. К среде, на которой готовилась посевная культура, вместе с кукурузного экстракта добавлялся гидролизат творожного альбумина из расчета по содержанию треонина в нем - 500 - 1000 мкг/мл.

Как показывают результаты, представленные на рис. 7а, б, посевная культура, приготовленная на среде с гидролизатом творожного альбумина /500мкг/мл треонина - среда 6/ обеспечивала довольно высокий уровень ферментации на средах 1Ф и 5Ф как по интенсивности роста, так и по биосинтезу лизина. 16-ти часовая инкубация посевной культуры, также как и в других вариантах опытов, вполне достаточна для получения физиологически активного посевного материала. Оптимальное количество посевных клеток, обеспечивающих хороший уровень ферментации, лежит в пределах от 100 тыс. до 100 млн. кл. на 10 мл.

Добавка гидролизата творожного альбумина с содержанием треонина 1000 мкг/мл (среда 7) не оказывала заметного стимулирующего действия на последующую ферментацию, наоборот, наблюдалось некоторое снижение титра клеток и выхода лизина. Повышение температуры до  $37^{\circ}$  при подготовке посевного материала на среде с гидролизатом творожного альбумина (1000 мкг/мл по треонину) неблагоприятно сказалось на последующей ферментации на среде 5Ф и особенно на среде 1Ф.

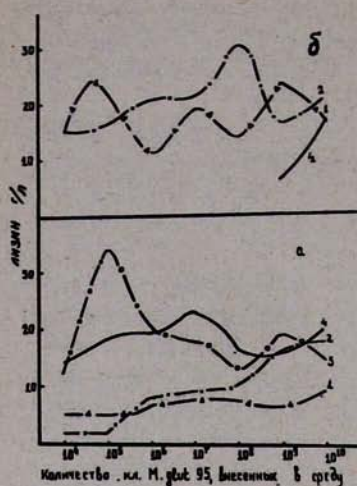


Рис.1. Посевная среда I

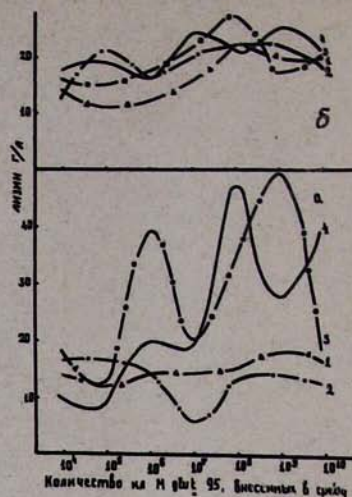


Рис.2. Посевная среда 2

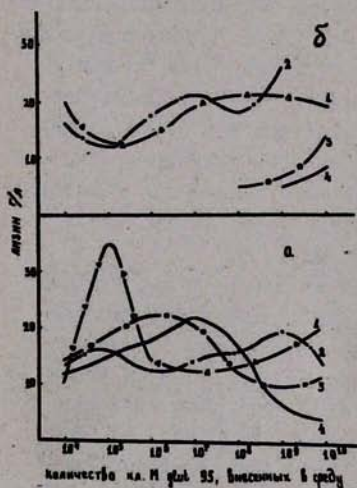


Рис.3. Посевная среда 3

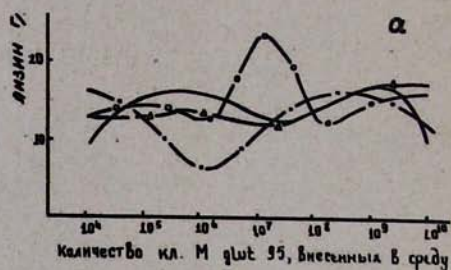


Рис.4. Посевная среда 4

Зависимость лизинообразования *M. glutamicus* шт. 95 от состава среды, продолжительности инкубации, температуры и количества посевного материала.

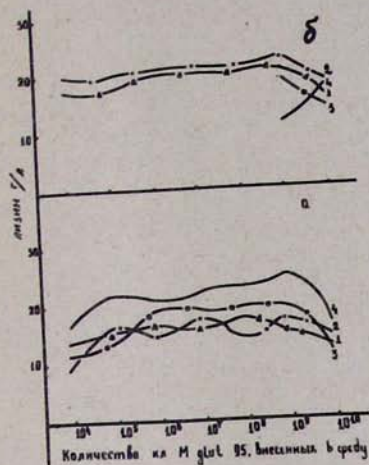


Рис.5. Посевная среда -8

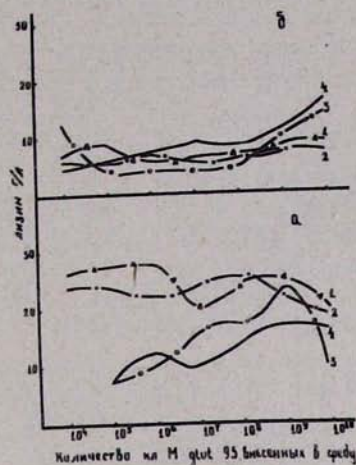


Рис.6. Посевная среда -5

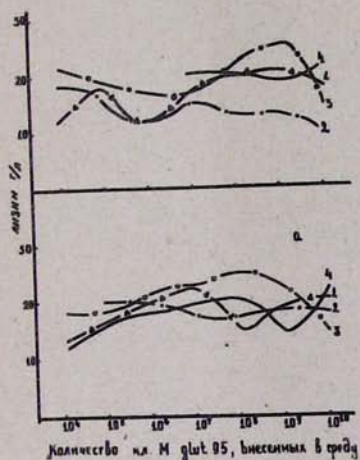


Рис.7. Посевная среда -6

Зависимость лизинообразования *M. glut. шл95* от состава среды, продолжительности инкубации, температуры и количества посевного материала: а-температура  $-30^{\circ}$ ; б-температура  $37^{\circ}$ ; кривые: I-инкубация 16час., ферментация на среде I-Ф; 2-инкубация 24час., ферментация на среде I-Ф; 3-инкубация 16 час; ферментация на среде 5-Ф; 4-инкубация 24 час., ферментация на среде 5-Ф.

С целью изучения влияния метода ступенчатой подготовки посевного материала на биосинтез лизина были поставлены опыты, в которых использовались среды различных составов как в качестве посевных, так и ферментационных.

Большое число комбинаций сред при двухступенчатой подготовке посевного материала, а также проведение ферментаций на пяти вариантах сред делает необходимым разбор результатов по отдельным опытам. В каждом опыте проводился учет кислотности среды (рН) и титра клеток через 72 часа; количество лизина определялось через 52 и 72 часа ферментации.

В опыте I первичной посевной средой была среда I, а вторичными — последовательно I, 5, 9, 10, 11 (рис. 8). В варианте опыта, где первичной и вторичной посевными средами была синтетическая среда I, при ферментации лишь на средах с сахаром-сырцом и кукурузным экстрактом (среда 9Ф) был получен эффект (14 г/л) в биосинтезе лизина по сравнению с контролем (7,0 г/л). Интересно отметить, что почти во всех вариантах ступенчатая подготовка посевной культуры привела к ускорению биосинтеза лизина, т.е. уже к 52 часам ферментации уровень биосинтеза мало отличался от такового к 72 часам, тогда как в контроле к этому времени количество лизина резко возрастало по сравнению с ферментацией на 52-ой час инкубации.

При сочетании первой и десятой сред на средах IФ и 5Ф выход лизина был несколько выше по сравнению с количеством лизина при ферментации на других средах.

В целом по опыту можно сказать о положительном влиянии метода ступенчатой подготовки посевной культуры на рост клеток и биосинтез лизина.

Использование среды I в качестве первичной при подготовке посевного материала не обеспечивало значительной интенсификации процесса лизинообразования по сравнению с контролем. В целом, по данному опыту, за исключением некоторых указанных уже выше вариантов, уровень биосинтеза лизина был сравнительно низким.

Необходимо отметить также, что в некоторых вариантах, например, при комбинировании среды I со средами 5 и 9 и при

ферментации на средах IФ и 9Ф титр клеток, хотя и достигал больших величин II–I4 млрд кл/мл, однако это довольно часто не коррелировало с выходом лизина.

Данные опыта 2 представлены на рис.9. В качестве первичной посевной среды использована среда 5 с мелассой и кукурузным экстрактом. При ферментации на среде IФ (синтетическая) высокий уровень лизинообразования обеспечивал посевной материал, полученный при комбинации посевной среды 5 со вторичными посевными средами IO и II (меласса с гидролизатом творожного альбумина и сахар-сырец с гидролизатом тв.альбумина). Сочетание среды 5 с посевными средами I,5,9 при ферментации на синтетической среде не оказало положительного эффекта и выход лизина был ниже, чем в контроле.

Проведение ферментации на среде 5Ф (с мелассой и кукурузным экстрактом) уже к 52-ому часу при чередовании посевной среды 5 со вторичными посевными средами 5,9,IO,II обеспечивало интенсивное лизинообразование (от I4–22 г/л). Удлинение ферментации до 72 часов не приводило к заметному увеличению количества лизина.

Посевной материал, полученный на посевной среде 5 со всеми испытуемыми в качестве вторичных посевных сред (I,5,9,IO,II), при ферментации на среде 9Ф (сахар-сырец с кукурузным экстрактом) обеспечивал выход лизина I6–20 г/л к 52 часу ферментации, что значительно превышало уровень биосинтеза в контрольном варианте (IO г/л).

В ферментациях на средах IOФ и IIФ с посевным материалом, полученным на первичной среде 5 и вторичных – 9,IO,II, уровень лизинообразования был несколько выше, чем в контроле, а при комбинации среды 5 со средами I и 5 количество лизина было ниже контрольного. Во всех вариантах опытов, где ступенчатость в подготовке посевного материала оказывала стимулирующее влияние на лизинообразование, процесс его активного биосинтеза сдвигался в сторону укорочения ферментации, т.е. процесс образования лизина заканчивался уже к 52 часу ферментации.

В целом по опыту можно сказать, что использование в качестве первичной посевной среды 5 при сочетании с другими средами в качестве вторичных во многих вариантах ферментаций привело к значительной интенсификации процесса лизинообразования по сравнению с контролем.

Следует подчеркнуть интересный факт: ступенчатая подготовка посевной культуры в условиях этого опыта привела к значительному укорочению процесса образования лизина и его синтез фактически заканчивался к 52 часу ферментации. Наиболее благоприятными ферментационными средами в опыте оказались среды 8 и 9Ф. В опыте, где в качестве первичной посевной использовалась среда 9 (сахар-сырец с кукурузным экстрактом), а в качестве вторичных I, 5, 9, 10, 11, данные представлены на рис.10.

Посевной материал, полученный при комбинации среды 9 со вторичной средой I, обеспечил высокий уровень биосинтеза лизина лишь в ферментации на среде 10Ф (меласса с гидролизатом творожного альбумина). Выход лизина к 52 часу процесса достигал 18 г/л и незначительно увеличился к 72 часу (20 г/л).

При ферментациях на других средах в этом варианте выход лизина был почти на уровне контрольного.

В серии опытов по подготовке посевного материала с последовательным использованием первичной посевной среды 9 и вторичной - среды 5, высокий выход лизина вновь получен на среде 10Ф. Его количество к 52 часу составляло 12 г/л и почти удвоилось к 72 часу (30 г/л). Неплохой результат по биосинтезу лизина (17 г/л) был получен также при ферментации на среде 11Ф. В других вариантах при использовании посевного материала, приготовленного ступенчато на средах 9 и 5, выход лизина был на уровне контрольного, хотя титр клеток в некоторых вариантах опыта достигал больших величин  $13 \times 10^9$  кл./мл.

Посевной материал, приготовленный на среде 9 как первичной посевной и на той же среде в качестве вторичной посевной, обеспечивал высокий уровень биосинтеза лизина на среде с мелассой и гидролизатом творожного альбумина (среда 11Ф) - 20 г/л, тогда как на других средах количество лизина было на

уровне контроля. Не было обнаружено сколько-нибудь заметного стимулирующего эффекта на биосинтез лизина при ферментациях на всех испытанных средах с посевным материалом, полученным на среде 9 со вторичной - 10. Сочетание посевных сред 9 и II последовательно при ферментации на среде IIФ и 9Ф обеспечивало до 16 г/л лизина в среде. Ферментация на других средах с этим вариантом посевной среды не показала стимуляции процесса лизинообразования.

На рис. II представлены данные опытов, где первичной посевной средой была среда 10, а вторичными - последовательно I, 5, 9, 10, II.

В этих опытах при ферментации на средах 5, 9, 10Ф уровень биосинтеза лизина в контроле был достаточно высоким, эффективного лизинообразования на этих же ферментационных средах получить не удалось: количество его к концу ферментации было на уровне контроля. При использовании ступенчатого метода при подготовке посевного материала к 52 часу ферментации в некоторых вариантах опыта уровень лизина был выше контрольного, что указывает на некоторую стимуляцию процесса. Небольшая активация синтеза лизина была получена при ферментации на среде IФ с посевным материалом, приготовленным при сочетании среды 10 со средами 5, 9, 10, II.

Аналогичные результаты были получены в опыте, результаты которого представлены на рис. I2. Посевной материал в этом случае готовился на среде II (первичная) при сочетании со средами I, 5, 8. Несколько более высокий выход лизина был получен в варианте, где посевной материал был получен от сочетания посевных сред II и I при ферментации на среде 5Ф; во всех остальных вариантах опыта выход лизина не превышал контроля.

Таким образом, метод ступенчатой подготовки посевной культуры, при использовании в качестве первичных посевных 10 и II сред (с гидролизатами творожного альбумина), не дал положительного эффекта, однако, подготовка посевной культуры только на этих средах без сочетания их с другими посевными средами обеспечивала высокий уровень биосинтеза лизина в ферментациях на средах I, 5, 9Ф.

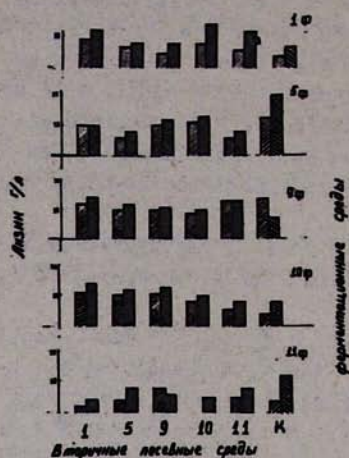


Рис.8. Первичная посевная среда - I

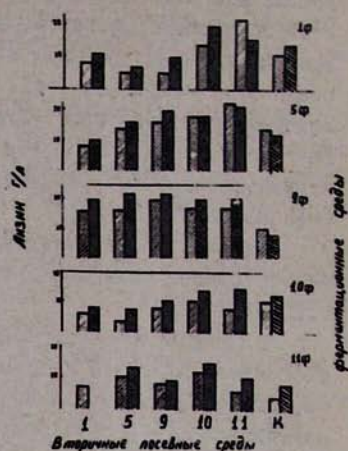


Рис.9. Первичная посевная среда - 5



Рис.10. Первичная посевная среда-9

Биосинтез лизина *M.glut.* №.95 при использовании посевного материала, приготовленного двухступенчатым способом:

■ - лизин к 52 часу ферментации;

■ - лизин к 72 часу ферментации.

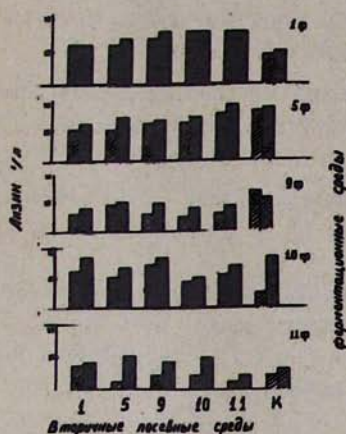


Рис.11. Первичная посевная среда - IО

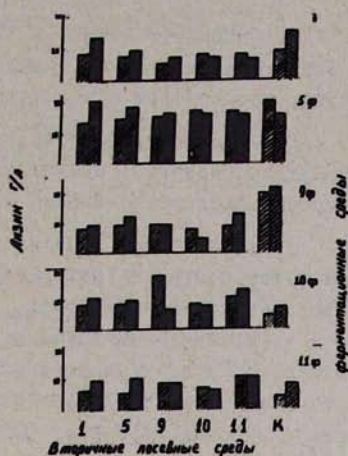


Рис.12. Первичная посевная среда - II

Биосинтез лизина *M. glutamicus* шт.95 с посевным материалом, приготовленным двухступенчатым способом:

-  - лизин к 52 часу ферментации;
-  - лизин к 72 часу ферментации.

## В ы в о д ы

1. Биосинтез лизина и бактериальный титр *M. glutamicus* шт. 95 в значительной степени определяется составом среды, температурой, количеством и возрастом посевного материала.

2. Посевной материал, полученный на богатых питательных средах, как правило, приводит к получению высокого титра клеток и уровня биосинтеза лизина в ферментации.

3. Оптимальный уровень биосинтеза лизина обеспечивается внесением посевного материала от I до 10 млн клеток на мл среды с 16-ти часовой инкубацией.

4. Посевной материал целесообразнее готовить на среде, близкой по составу к ферментационной; однако, если посевной материал готовится на синтетической среде, а ферментация ведется на среде другого состава, оптимальный уровень биосинтеза лизина может быть получен за счет увеличения посевного материала, или повышения температуры до 37° в момент его подготовки, или добавки дрожжевого автолизата.

5. Повышение температуры (до 37°C) при подготовке посевного материала сказывается отрицательно на уровне ферментации, если и подготовка посевной культуры, и процесс ферментации идут на среде с одинаковым составом.

6. Эффективность метода ступенчатой подготовки посевной культуры *M. glut.* зависит от состава посевных и ферментационных сред, и в первую очередь от состава первичной посевной среды.

7. Оптимальный выход лизина и укорочение сроков его образования с использованием метода ступенчатой подготовки посевной культуры был получен при использовании в качестве первичных посевных 5-ой и 9-ой сред.

8. Использование первичных посевных сред 10 и 11 при любом сочетании со вторичными посевными средами не стимулировало процесса лизинообразования при ферментации на всех использованных нами средах.

Զ. Վ. Սարչավինա, Ս. Գ. Ասլանյան

ՆԻԶԻՆԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ M. GLUTAMICUS ՀՏ-95-Ի ԿՈՂՄԻՃ՝  
ԵԱՄԵԼՍԵՑՈՒԹԻ ԵԱԽԱՊԱՏՐԱՍՏԱՆԵ ՏԱՐԲԵՐ ԳԱՅՄԱՆԵՆՈՒՄ

# Ա մ փ ո փ ու մ

Բիոլոգիական ակտիվ նյութերի ստացման համար արդյունաբերական մեջ Օգտագործվող միկրոօրգանիզմների բիոսինթետիկ գործունեությունը մեծ կախով կախված է ցանքասնյուրի որակից: Ծանփասնյուրի որակն իր հերթին կախված է միկրոօրգանիզմների քանակից, որանց կենսունակությունից, հասակից և այլն:

Աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել ցանքսի սննդամիջոց - վայրի կազմի և *Micrococcus glutamicus* 95 շտամի ցանքասնյուրի նախապատրաստման աստիճանական մեթոդի ազդեցությունը լիզինի բիոսինթեզի վրա՝ 5 տարբեր սննդանյութերում տարվող ֆերմենտացիայի դեպքում:

Արդյունքներից պարզվում է, որ 16-18 ժամվա ինկուբացիան այն ցանքսային սննդամիջավայրում, որն իր կազմով մոտ է ֆերմենտացիայի ժամանակ Օգտագործվող միջավայրին, ապահովում է լիզինի Օպտիմալ քանակների առաջացումը:

Լիզինի քանակը կարելի է ավելացնել ցանքսի կուլտուրայի սննդանյութը շաքարանկային ավտոլիզատով հարստացնելու միջոցով: Ծանփասնյուրի նախապատրաստման երկաստիճանային մեթոդի դեպքում լիզինի բիոսինթեզի վրա ամենաշատ ազդեցություն է թողնում առաջնային ցանքսի միջավայրի կազմը: Երկրորդային ցանքսի միջավայրի կազմի ազդեցությունը սահմանափակվում է հենց իր՝ կուլտուրայի վերացանքսի բնույթով, որը հանգեցնում է լիզինառաջացման մակարդակի ըարժացմանը և ֆերմենտացիայի ժամկետի կրճատմանը:

Z.V.Marshavina, S.G.Aslanian

ON THE PREPARATION OF INOCULUM FOR  
FERMENTATION OF LYSINE BY MICROCOCCUS  
GLUTAMICUS.

## S U M M A R Y

The aim of the work was to study the influence of medium -composition, the time of incubation and preliminary transfers of the preparation of inoculum of *M. glutamicus* strain 95 on biosynthesis of lysine during the fermentation in five different media. The obtained indicate that the inoculum, cultivated for 16-18 hours in media, being close to the fermentation media provided an optimum for lysine biosynthesis. The yield of lysine can be increased by adding of yeast extract to the cultural medium. The greatest influence on the biosynthesis of lysine is to be the composition of first inoculum medium in case of two-step method of the preparation of inoculum. The influence of second inoculum medium of *M. glutamicus* strain 95 is limited by the passage (transfer) of the bacterial culture which increases the yield of lysine and reduce the time of final fermentation.