

А.М.Малхасян, Э.А.Мароян

СИНТЕЗ РОСТОВЫХ ВЕЩЕСТВ КУЛЬТУРОЙ *MICROSOCOCCUS GLUTAMICUS* ШТ.95 И ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА БИОСИНТЕЗ ЛИЗИНА

В последние годы большое внимание уделяется вопросам синтеза физиологически активных веществ различными группами микроорганизмов. Особое место среди них занимают ауксины (Красильников, 1958; Паносян и др. 1961), гиббереллины (Муромцев, 1962) и витамины (Бобкова, 1965, 1967; Гуринович, 1968).

В настоящей работе приводятся данные по изучению образования ауксино- и гиббереллиноподобных веществ, а также β -каротина культурой *Microsoccus glutamicus* шт.95 (продуцент лизина) и влияние гибберелловой кислоты / A_3 / на рост и биосинтез лизина.

Материал и методы

Способность культуры *M. glutamicus* шт.95 выделять в среду β -индолилуксусную кислоту /ИУК/ определяли путем инкубирования ее на жидких питательных средах, содержащих кукурузный экстракт, мелассу и хлористый аммоний. Культура бактерий выращивалась на качалке с 180 об/мин., при 27°С, в течение трех суток.

ИУК и гибберелловую кислоту / A_3 / определяли в биомассе и культуральной жидкости. Для этого трехсуточную суспензию культуры центрифугировали в течение 20 мин. при 3000 об/мин для отделения биомассы от жидкости. Затем биомассу растирали со стеклянным порошком и к полученному гомогенату добавляли цитратно-фосфатный буфер с pH-2,5 и *n*-бутанол. Содержимое переносили в делительные воронки, встряхивали в течение 10 мин, и оставляли на 1 час для разделения фракций. К бутанольной фракции добавляли равное количество фосфатного буфера с pH 7,0, встряхивали и оставляли для разделения фаз. В водном

слое ИУК определяли по методу Бояркина /1947, 1948/.

Нативную жидкость с момента добавления цитратно-фосфатного буфера с pH - 2,5 и Н-бутанола подвергали тем же манипуляциям. Затем водные экстракты из биомассы и нативной жидкости культуры *M. glutamicus* шт.95 подвергались хроматографическому разделению. Для идентификации ИУК использовали смесь растворителей: Н-бутанол - аммиак - вода в соотношении 4:1:5; гиберелловой кислоты / A_3 / - изопропиловый спирт и вода в соотношении 5:2. Полученные хроматограммы разрезались на сегменты, в каждом из которых содержание ИУК и гиберелловой кислоты определялось по ростовой реакции: в первом случае - на колеоптилях пшеницы сорта "Арташат-42", во втором - на ростках карликового гороха сорта "Пионер" по методу Муромцева и др.

Количество β -каротина определялось в биомассе *M. glutamicus* шт.95 по методу Сапожникова /1961/. Для этого культуру инкубировалась на жидких средах в одном случае с глюкозой, в другом - с мелассой, с добавкой треонина, метионина и биотина при 27° на качалке с 180 об/мин в течение трех суток, а также на агаризованной среде Хоттингера в течение 9 суток. Биомассу из жидких питательных сред получали центрифугированием культуральной жидкости, а с агаризованных сред - путем соскабливания с поверхности среды. В том и другом случае к полученной биомассе добавляли $NaHCO_3$ с целью нейтрализации клеточного сока и Na_2SO_4 для поглощения воды. В дальнейшем биомассу растирали со стеклянным порошком и помещали на кварцевый фильтр № 3 для извлечения пигментов метанолом. Полученный фильтрат наносили на хроматографическую бумагу. Пятно разгонялось в системе растворителей: петролейный эфир и бензол в соотношении 1:3. Каротиноидное вещество эликировалось петролейным эфиром или бензином и идентифицировалось по максимуму поглощения в синей области спектра, а также по содержанию в нем гидроксильных и эпокси групп.

Влияние гиберелловой кислоты на процесс лизинообразования изучалось в процессе ферментации *M. glutamicus* шт.95 на синтетической среде %/: глюкоза - 10,0; NH_4Cl - 3,0;

KH_2PO_4 - 0,03; K_2HPO_4 - 0,1; MgSO_4 - 0,03; CaCO_3 - 2,0; DL-треонин - 1 мг/мл; DL-метионин - 0,4 мг/мл; биотин - 20 мкг/л. Гибберелловая кислота вносилась в среду в концентрациях 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 мг/мл методом подкормки через 24, 48, 60 и 82 часа ферментации.

Обсуждение результатов

Ростовое действие элюатов с хроматограмм, условно разделенных на 10 сегментов, проверялось на колеоптилях пшеницы. Для этого колеоптили, нанизанные на стеклянные иглы помещались в элюаты с сегментов хроматограммы и выдерживались 24 часа. Под влиянием элюатов в зависимости от наличия в них ростовых факторов колеоптиль удлинялись; по активности этой реакции судили о содержании в элюате ИУК. Как показали наши наблюдения, ИУК на хроматограмме располагается в 2 и 3 сегментах. Наибольшей ростовой активностью в наших опытах обладали элюаты с 3-го сегмента (R_f - 0,25), что говорило о наличии ИУК.

Данные, приведенные в таблице I, свидетельствуют о наличии в культуральной жидкости и, в меньшей степени, в биомассе *M. glutamicus* шт.95 вещества, подобного гетероауксину.

Таблица I

Синтез гетероауксина культурой *Micrococcus glutamicus* шт.95

Объекты исследования	Длина 10 колеоптилей в мм
Биомасса	70
Культуральная жидкость	80
<u>Контрольные растворы</u>	
Питательная среда	63
Раствор гетероауксина 0,01%	80
Цитратный буфер	64
Дистиллированная вода	60

Таблица 3

Биосинтез лизина *Micrococcus glutamicus* шт.95
на синтетической среде с гибберелловой кислотой /ГК/

Гибберелловая кислота /А ₃ / мкг/мл	Время вне- сения ГК А ₃ в фермен- тацию	Титр x 10 ⁹ кл/мл			Лизин, г/л
		Ферментация, в часах			
		48ч.	80ч.	48ч.	80ч.
300	До начала	6,1	5,4	14,2	13,8
	через 24ч.	5,7	5,3	12,5	14,2
	" 48ч.	5,3	5,3	11,2	12,7
400	До начала	6,3	5,3	11,0	14,7
	через 24ч.	6,3	5,4	13,1	12,1
	" 48ч.	-	5,3	13,3	13,1
500	До начала	6,3	5,3	11,3	15,0
	через 24ч.	5,3	5,3	9,6	13,7
	" 48ч.	5,1	5,4	9,2	11,0

В ы в о д ы

1. Культура *Micrococcus glutamicus* шт.95 синтезирует β-индолилуксусную кислоту, которая обнаруживается в пределах 90-100 мкг/мл в культуральной жидкости и 90 мкг/мл - в биомассе.
2. Культура *M. glutamicus* шт.95 продуцирует гиббереллиноподобные вещества до 1мкг/мл в культуральной жидкости и до 0,8 мкг/мл в биомассе.
3. Культура *M. glutamicus* шт.95, выращенная на агаризованной среде с мелассой наиболее эффективно продуцирует β-каротин.

4. Гибберелловая кислота оказывает стимулирующее действие на процесс биосинтеза лизина. Наиболее эффективной дозой стимулирующего действия ее следует считать концентрацию 200-300 мкг/л.

ԱՄՄԱՆԱՄԱՅԱՆ, ԷՄՄՈՐՈՅԱՆ

ԱՄՄԱՆ ՇՈՒԹԵՐԻ ԱՐՏԱՌՈՒՄԸ *Micrococcus glutamicus* 95
 ԵՏԱՄԻ ԿՈՂՄԻՑ ԵՎ ԳԻԲԵՐԵԼԻՆԱԹԻՍ ԱԶՈՒՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԼԻԶԻՆԻ
 ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ

Ա Մ Փ Ո Փ ՈՒ Մ

Ուսումնասիրվել է առաքանական և գիբերելինաձև նյութերի
 ինչպես նաև β -կարոտինի արտադրումը *Micrococcus glutamicus* 95 շտամի կողմից և գիբերելինա-
 թթվի ազդեցությունը *Micrococcus glutamicus* 95 շտամի կողմից և գիբերելինա-

Այս ուղղությամբ կատարված հետազոտությունները ցույց տվե-
 ցին, որ *Micrococcus glutamicus* 95 շտամը ընդունակ
 է արտադրելու առաքանական գիբերելինաձև նյութեր (100 մկգ/
 լմլ և 1 մկգ լմլ), ինչպես նաև β -կարոտին և վերջինիս
 համար ծպտիմալ սննդանյութը հանդիսանում է ագարային սննդանյութը
 մեկսայի հետ:

Լիզինի առավել սինթեզի համար գիբերելինաթթվի 200-300 մկգ/մլ
 ամենաէֆեկտիվ քանակն է: Գիբերելինաթթուն արագացնում է նաև
 Լիզինի սինթեզի ժամանակամիջոցը:

A.M. Malchassian, E.A. Maroian.

BIOSYNTHESIS OF GROWTH-STIMULATING SUBSTANCES
 BY *M. GLUTAMICUS* AND THE INFLUENCE OF GIBBEREL-
 LIC ACID ON LYSINE BIOSYNTHESIS.

Summary

It has been studied the distinguishment exit of auxin and gibberellin-like substances and carotin by the *Micrococcus glutamicus* strain 95 producer of lysine and also the influence of gibberellic acid on lysine biosynthesis. It was found that *M.glutamicus* strain 95 is able to produce auxin and gibberellin-like substances (100mg/ml) and β -karotin.

On medium with molasses 200-300 mg/ml of gibberellic acid is enough for stimulating of lysine biosynthesis. In this condition the shortening process of lysine biosynthesis and the increase of lysine yield about 10-25% compared with the control have been noted.