

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ ФОСФОРА НА БИОСИНТЕЗ
ЛИЗИНА МУТАНТАМИ *M. GLUTAMICUS*

Имеется большое число работ, посвященных изучению роли фосфорных соединений в жизни микроорганизмов. Фосфор входит в состав важнейших структурных и энергетических соединений клетки, но в отличие от серы и азота фосфор встречается только в окисленном состоянии, в форме высшего окисла P_2O_5 . Лучшими источниками фосфора, поэтому, являются различные соли ортофосфорной кислоты.

Однако, изучение фосфорного обмена у разных микроорганизмов показало, что избыток фосфора может угнетать те или иные процессы в клетке.

Известно, например, что максимальное образование антибиотика окситетрациклина происходит при определенном содержании фосфора. Избыток последнего приводит к накоплению биомассы и снижению выхода антибиотина в 5-6 раз. (Z. Walter A., 1964). По данным Н.Н.Казининой (1967) резкое снижение содержания ортофосфора в среде не вызвало заметных сдвигов в характере маслянокислого брожения.

Биосинтез мономицина по данным В.К.Коваленковой (1966), происходит при наличии в среде большого количества углеводов и недостатке фосфора. Если продукт обеспечен избытком фосфора, мономицин не образуется. Коптярёвой и Асеевой (1968) было установлено, что в отсутствии фосфора и магния в среде прекращается биосинтез валина продуктом.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных минеральных источников фосфора на биосинтез лизина мутантными штаммами *M. glutamicus* 8, 28, 95 при ферментации на различных средах.

Объекты и методы

Работа проводилась с гомосеринзависимыми мутантами *M. glut.* шт. 95, 28, 8. Ферментации ставились в Эрленмейеровских колбах (250мл.) с 10-20мл среды при температуре 28-30°C, на

началке с 230-240 об/мин. в течение 72 часов. В качестве ферментационных сред использовались: среда I (%): меласса -15,0; кукурузный экстракт - 3,0; NH_4Cl -1,5; CaSO_4 -2,0; среда 2-глюкоза -10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ -0,03; Д 1- треонин-1мг/мл; Д 1-метионин - 0,4мг/мл, биотин - 20 $\mu\text{г/л}$, CaSO_4 -2,0. Источниками фосфора служили соли: KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{NH}_4/\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, в концентрациях по "р" -0,01; 0,03; 0,05%.

Посевной материал инкубировался на качалках в течении 16-18 часов на среде, (%): меласса -3,0; кукурузный экстракт-3,0; NaCl -0,4, pH - 7,5.

В зависимости от цели опыта либо в конце, либо по ходу ферментации, через каждые 24 часа, определялись: лизин-методом разделительной количественной хроматографии на бумаге, сахара-по методу Бертрана-Шорли, титр клеток - нефелометрически. Кислотность среды в течении ферментации поддерживалась на уровне 7,5, для индикаций в среду добавлялся фенолрот.

Результаты и их обсуждение

Основным источником фосфора для продуцентов лизина при микробиологическом способе его получения является кукурузный экстракт, содержащий до 1% фосфора (на сух.вес). В таблице I представлен состав сырья, используемый при получении лизина.

Состав сырья

Таблица I

С ы р ь е	Сухие вещест- ва, %	Содержание в % на сухой вес				
		P	M	NH_2	сахара	зола
Кукурузный экстракт	53,0	1,02	7,4	2,2	6,0	9
Меласса	72,0	0,038	2,1	не опр.	50,8	не опр.

Опыты по изучению влияния фосфора на биосинтез лизина при ферментации на различных средах показали, что недостаток фосфорных солей приводит к нарушению процесса лизинообразования. Добавка фосфора, в этом случае, как правило, интенсифицирует биосинтез лизина (Севрук, Маршавина и др., 1971). Нами бы-

ли поставлены опыты с целью выяснить влияние избыточного количества фосфора на биосинтез лизина при ферментации мутантов *M. glutamicus* шт. 95, 28, 8 на средах с мелассой и кукурузным экстрактом. Для этого к ферментационной среде добавлялся однозамещенный калий-фосфат в концентрациях по "р" $-0,01; 0,03; 0,05; 0,08\%$. Как показывают результаты таблицы 2 степень и характер влияния на ферментационный процесс различных концентраций калий-фосфата, или точнее избыточного фосфора в среде, не зависели от особенностей продуцентов лизина и не оказывали заметного влияния на процесс биосинтеза лизина. Однако, опыты поставленные с добавками различных солей ортофосфорной кислоты при ферментации *M. glutamicus* 95. на средах с мелассой и кукурузным экстрактом показали (таблица 3), что культура не реагировала на избыток фосфора в среде, если он давался в виде калийных солей. Тогда как добавки однозамещенных натриевых и аммонийных солей ортофосфорной кислоты значительно снижали выход лизина, а их двузамещенные аналоги ингибировали процесс лизинообразования. Таким образом, аммонийные и натриевые соли ортофосфорной кислоты на фоне кукурузного экстракта или на фоне органического фосфора оказывали ингибирующее действие на процесс лизинообразования.

Опыты по культивации продуцентов лизина *M. glutamicus* шт. 95, 28, 8 на синтетической среде с различными солями ортофосфорной кислоты показали, что они также не безразличны к источнику фосфора (таблица 4). Наиболее допустимыми и благоприятными источниками фосфора для *M. glutamicus* 95 и 28 являются одно и двузамещенные калийные соли ортофосфорной кислоты. Тогда как при ферментации с этими солями у *M. glutamicus* 8 лизин почти не синтезировался.

Использование в качестве источника фосфора натриевых и аммонийных солей ортофосфорной кислоты при ферментации мутантов на синтетической среде с глюкозой так же как и на среде с мелассой и кукурузным экстрактом привело к нарушению процесса биосинтеза, в среде наблюдались либо следы, либо полное отсутствие лизина. Реакция на натрий и аммоний-фосфат в процессе ферментации у изученных нами мутантов была одинаковой. Однако, отсутствие лизина в среде не коррелировало с ростовыми функ-

Таблица 2

Влияние избыточного фосфора на биосинтез
лизина *M. glutamicus* на среде с мелассой
и кукурузным экстрактом

Культу- ры <i>M. glu- tamicus</i>	Кол-во KH_2PO_4	% "р"	Ферментация, час						Оста- точн. сахара
			24		48		72		
			титр кл $\times 10^9$ мл	ли- зин г/л	титр кл $\times 10^9$ мл	ли- зин г/л	титр кл $\times 10^9$ мл	ли- зин г/л	
95	0,044	0,01	6,4	5,5	7,6	15,3	8,8	18,7	0,11
	0,132	0,03	6,4	6,4	6,6	14,4	7,6	18,4	0,5
	0,220	0,05	5,7	7,6	8,2	14	8,8	16,9	0,2
	0,352	0,08	5,3	6,8	8,0	15	8,8	18,18	1,3
	контроль		5,0	6,2	7,8	14,3	8,2	17,1	0,4
8	0,044	0,01	6,6	7,3	9,2	12,1	10,1	16,5	0,3
	0,132	0,03	6,2	7,5	7,4	12,6	8,2	13,5	0,2
	0,220	0,05	4,5	7,6	9,0	14,6	9,8	15,6	0,5
	0,352	0,08	5,4	7,2	8,3	13,5	9,0	16,8	0,5
	контроль		9,3	7,1	9,4	13,0	10,1	15,3	0,5
28	0,044	0,01	7,1	6,6	7,4	12,2	8,4	16,6	0,6
	0,132	0,03	6,8	6,5	7,4	12,7	8,9	17,7	0,6
	0,220	0,05	6,8	6,4	7,5	12,8	8,8	16,8	0,5
	0,352	0,08	6,3	5,7	7,6	12,7	9,1	19,6	0,6
	контроль		4,8	6,03	6,5	12,6	8,6	20,6	0,3

Таблица 3

Влияние различных солей ортофосфорной кислоты
на биосинтез лизина *M. glutamicus* 95 на
среде с мелассой и кукурузным экстрактом

Источники фосфора	Количество фосфора в среде, %	Через 72 часа ферментации	
		Титр, кл. $\times 10^9$ /мл	Лизин, г/л
K_2HPO_4 $\times 3H_2O$	0,01	6,8	11,2
	0,03	6,8	9,9
	0,05	6,5	13,0
NaH_2PO_4 $\times 2H_2O$	0,01	8,6	9,9
	0,03	5,9	7,4
	0,05	7,2	9,2
Na_2HPO_4 $\times 12H_2O$	0,01	7,6	следи
	0,03	8,3	следи
	0,05	6,3	5,0
$NH_4H_2PO_4$	0,01	6,2	7,2
	0,03	8,3	4,0
	0,05	7,4	3,2
/ $NH_4/2PO_4$	0,01	6,6	следи
	0,03	8,2	следи
	0,05	8,3	следи
Контроль		6,9	12,8

Таблица 4

Влияние катионов Na , K , NH_4 на биосинтез
лизина мутантами *M. glutamicus* на син-
тетической среде

Источники фосфора	Культура M. glut. шт.	Титр кл. х 10 ⁹ мл		Лизин, г/л		Оста- точные сахара %
		Ферментация, час				
		48	72	48	72	
K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	95	4,7	5,7	3,3	16,6	2,6
	28	5,7	6,2	5,3	22,6	1,3
	8	1,5	3,3	сл.	2,0	5,9
Na ₂ HPO ₄	95	2,7	3,1	—	сл.	0,25
	28	2,9	4,2	—	"	0,5
	8	2,2	5,9	—	"	0,3
NaH ₂ PO ₄	95	2,6	5,3	—	"	0,47
	28	3,1	5,5	—	"	0,51
	8	2,4	5,7	—	"	0,43
/ NH ₄ /2HPO ₄	95	3,6	5,1	—	"	0,6
	28	4,0	5,1	—	"	0,93
	8	2,5	5,2	—	"	0,62
NH ₄ H ₂ PO ₄	95	3,4	6,0	—	"	0,7
	28	4,2	5,7	—	"	0,8
	8	3,3	5,8	—	"	0,6

Таблица 5

Влияние катионов Na, K, Ca, NH₄ на
биосинтез лизина *M. glutamicus* шт.95
на среде с мелассой и кукурузным
экстрактом

С о л и	Концентрация, %	Л и з и н, г/л	Титр клеток, х 10 ⁹
NaCl	0,5	7,2	21,9
	1,0	9,1	22,2
	3,0	7,8	26,5
	5,0	6,2	21,2
KCl	0,5	7,4	23,7
	1,0	7,9	22,2
	3,0	6,9	21,4
	5,0	7,8	28,0
CaCl	0,5	7,5	22,7
	1,0	8,2	22,0
	3,0	7,5	17,3
	5,0	4,7	18,0
NH ₄ Cl	0,5	8,0	22,1
	1,0	7,1	21,0
	3,0	8,8	19,8
	5,0	7,0	22,7
Контроль		6,8	25,1

циями продуцентов, характер нарастания титра клеток не отличался от такового в контрольном варианте с использованием калий фосфатов. Отрицательное влияние натрия и аммоний фосфатов связано повидимому с катионами Na^+ и NH_4^+ и чем больше их в среде, как это имело место с двузамещенными солями ортофосфорной кислоты, тем сильнее их отрицательное влияние на процесс лизинообразования.

Однако внесение в среду с мелассой и кукурузным экстрактом катионов натрия, калия, кальция и аммония в составе хлористых солей в концентрациях от 0,5 до 5% не оказывали существенного влияния на биосинтез лизина культурой *M. glutamicus* шт. 95 (таблица 5).

Небольшое исключение составлял хлористый кальций, который в концентрациях 3-5% снижал выход лизина до 17 г/л. Хлористый натрий и калий наоборот - в концентрациях 3-5% несколько интенсифицировали процесс образования лизина.

Известно по литературным данным, что на лучшую усвояемость фосфатов влияет магний. Для этого на фоне четырех концентраций калий фосфата в среду с мелассой и кукурузным экстрактом добавлялся сернокислый магний в трех различных концентрациях. Как показывают данные таблицы 6, внесение магния в среду на фоне различных концентраций фосфатов несколько стимулировало процесс лизинообразования по сравнению с вариантами опытов с повышенным содержанием фосфатов.

Поставленные эксперименты позволяют сделать некоторые выводы.

В ы в о д ы

1. Недостаток фосфора в среде при ферментации шт.95 приводит к нарушению процесса биосинтеза лизина.
2. Калийные соли ортофосфорной кислоты являются хорошим источником фосфора при ферментации мутантов.
3. Однозамещенные аммонийные и натриевые соли ортофосфорной кислоты снижают выход лизина, а их двузамещенные аналоги ингибируют процесс лизинообразования. Подобная закономерность наблюдалась при ферментации как на синтетической, так и на среде с мелассой и кукурузным экстрактом.

4. Катионы натрия и аммония в составе хлористых солей в концентрациях от 0,5 до 5% не оказывают существенного влияния на биосинтез лизина.
5. Внесение магния в среду на фоне различных концентраций фосфатов несколько стимулирует процесс лизинообразования.

Զ. Վ. Մարշալիև, Զ. Շ. Բաղդասարյան

ՖՈՍՖՈՐԻ ՏՄՐԲԵՐ ԱՂԲՅՈՒՐԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
 ԼԻԶԻՆԻ ԲԻՍԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ M. GLUTAMICUS -Ի
 ՇՏԱՄԵՐԻ ՄՈՏ

Ա մ ֆ ո ֆ ու մ

Ուսումնասիրվել է ֆոսֆորի հանքային աղերի ազդեցությունը
 Լիզինի բիոսինթեզի վրա՝ M. glutamicus -ի շտամերը [25, 28, 8]
 տարբեր միջավայրերի վրա աճեցնելիս:

Եռյց է տրված, որ միջավայրում ֆոսֆորի պակասը բերում է
 Լիզինի բիոսինթեզի պրոցեսի խանգարմանը: Ֆոսֆորի լավ աղբյուր
 է Օրթոֆոսֆորական թթվի կալիումական աղը, Օրթոֆոսֆորական
 թթվի ամոնիումի և նատրիումական մեկ-տեղական պակաս աղերը պակաս
 սեցնում են Լիզինի ելքը, իսկ սրանց երկտեղական պակաս աղերը —
 ներս ընդհանրապես արգելակում են Լիզինազոյացումը: Լիզինի
 բիոսինթեզի պրոցեսը որոշ չափով խթանվում է միջավայրում
 մագնեզիումի առկայությամբ:

Z.V.Marshavina, Z.N.Bagdasarian

THE INFLUENCE OF SOME SOURCES OF PHOSPHORUS
ON THE LYSINE BIOSYNTHESIS BY MUTANTS OF
M. GLUTAMICUS

S u m m a r y

The influence of some mineral phosphorous sources on the lysine biosynthesis during the fermentation in several media has been studied.

The results of investigations have shown that a good source for phosphorus may be potassium salts of orthophosphorous acid. One-substituted ammonia and sodium salts of orthophosphorous acid decrease the process of lysine biosynthesis, while two-substituted ones inhibit this process at all.