

М. А. ТЕР-КАРАПЕТЯН, Л. Г. АНАНЯН

ИЗМЕНЕНИЯ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *LASTOBACTERIUM*

Обмен азотсодержащих соединений между культуральной средой и клетками микроорганизмов в течение цикла их роста является процессом, отражающим избирательную способность данной культуры поглощать и включать в метаболизм различные азотистые компоненты среды, биосинтетическую активность ее и свойство выделять во внешнюю среду отдельные аминокислоты и др.

Совокупность этих процессов обусловлена как физико-химическими факторами, в частности, наличием питательных веществ культуральной среды, так и свойствами, присущими данным бактериям, приобретенными и закрепленными в филогенезе.

Управление процессами обмена азотсодержащих соединений между микроорганизмами и внешней средой имеет большое значение в тех случаях, когда основной задачей является оценка степени поглощения из среды азотистых метаболитов, служащих источниками питания и накопления продуктов их превращения в синтезируемой биомассе, или когда происходит перенос и накопление в среде одной или нескольких аминокислот, являющихся продуктами жизнедеятельности данной культуры.

Несмотря на большое число работ [1—6, 10], посвященных изучению явлений поглощения и выделения клетками аминокислот в культуральной среде в отношении многих микроорганизмов, этот вопрос еще мало изучен у молочнокислых бактерий, так как сложные естественные среды (молоко и молочные продукты и др.), где они развиваются, создают серьезные методические затруднения для оценки протекающих процессов. Трудно также оценить механизм накопления аминокислот в среде—происходит ли оно путем выделения их из интактных клеток или является результатом автолиза микробных тел.

Разработанные за последние годы полусинтетические и синтетические среды [8, 9, 11] для культивирования молочнокислых бактерий создают объективные предпосылки для детального изучения метаболизма и химизма последних. Особенно удобны упомянутые среды для изучения цикла роста данной группы микроорганизмов и точного выбора той фазы (экспоненциальная), где автолиз минимален, а также для оценки интенсивности обмена метаболитами между клетками и культуральной

средой. Это является косвенным показателем биохимической активности изучаемой культуры.

Настоящая работа преследует цель изучить состояние общего и аминного азота, а также ряда аминокислот в полусинтетической среде в процессе выращивания некоторых представителей рода *Lactobacterium*. Полученные результаты послужат основанием для проведения баланса как общего и суммарного аминного азота, так и отдельных аминокислот между растущей биомассой и культуральной средой для определения интенсивности усвоения и синтеза отдельных или групп аминокислот, а также степени выделения их в культуральную среду.

Описанные явления отражают состояние культуры в конце экспоненциальной фазы, где автолиз клеток носит только спорадический характер, о чем свидетельствуют как непосредственные микроскопические наблюдения, так и результаты ранее опубликованных работ [7].

Методика. Объектом исследования служили три штамма гомоферментативных палочковидных бактерий из рода *Lactobacterium*: *L. bulgaricum*-743, *L. casei*-915, *L. lactis*-1694, полученных с кафедры молочного дела Ереванского зооветеринарного института.

Состав и приготовление полусинтетической среды, способ выращивания культур, а также определение разных форм азота и аминокислот (АК) в полученной биомассе проводились по ранее описанной методике [7].

В настоящей работе исследовались исходная среда (контроль, без посева) и культуральная жидкость (освобожденная от бактерий).

Контрольная (незараженная бактериями) колба с объемом среды 100 мл и опытная колба (зараженная) с объемом среды 500 мл ставились на инкубирование в термостат при температуре 45—48°C в течение 3-х суток. В конце опыта выращенная бактериальная масса отделялась от культуральной жидкости центрифугированием при 8000 об/мин в течение 20 мин; для соблюдения одинакового режима контрольная среда также подвергалась центрифугированию.

Определялись в них общий азот (N), аминный азот $N(NH_2)$ и аминокислоты. $N(NH_2)$ содержащие соединения, состоящие в основном из аминокислот и других проявленных нингидрином соединений, определялись до и после гидролиза с целью суммарной оценки степени их конденсации. Проведение в исходной среде и в культуральной жидкости подобного анализа позволяет оценить протеолитическую активность растущей культуры.

1. Изменение общего и аминного азота культуральной среды при выращивании молочнокислых бактерий. Содержание общего и аминного азота в культуральной среде перед посевом и после выращивания трех видов молочнокислых бактерий до конца экспоненциальной фазы приведено в табл. 1 и на рис. 1.

Приведенные результаты соответствуют данным опытов, изложенным в нашей предыдущей работе [7], где указано содержание азотсодержащих соединений биомассы соответствующих штаммов.

Таблица 1

Общий и аминный азот в культуральной среде до и после выращивания
молочнокислых бактерий.

Данные в мг азота в 100 мл среды

Дата опытов	N общий			N (NH ₂) до гидролиза			N (NH ₂) после гидролиза		
	до посева	после посева	баланс	до посева	после посева	баланс	до посева	после посева	баланс
<i>L. lactis</i> —1694									
22.2.67	241,2	254,0	+12,1	40,0	50,0	+10,0	179,0	192,0	+13,0
16.8.67	226,0	237,0	+11,0	40,0	46,0	+6,0	—	—	—
22.5.68	—	—	—	42,5	47,0	+4,5	179,2	188,0	+8,8
<i>L. bulgaricum</i> —743									
24.1.67	243,4	263,1	+19,7	50,0	65,0	+15,0	243,2	262,0	+18,8
5.7.68	225,4	240,9	+15,5	38,0	47,0	+9,0	211,0	230,4	+19,4
<i>L. casei</i> —915									
1.3.63	210,0	216,0	+6,0	—	—	—	—	—	—
7.2.67	230,0	236,0	+6,0	38,0	48,0	+10,0	180,0	192,2	+12,2
14.1.63	248,0	258,0	+10,0	—	—	—	—	—	—

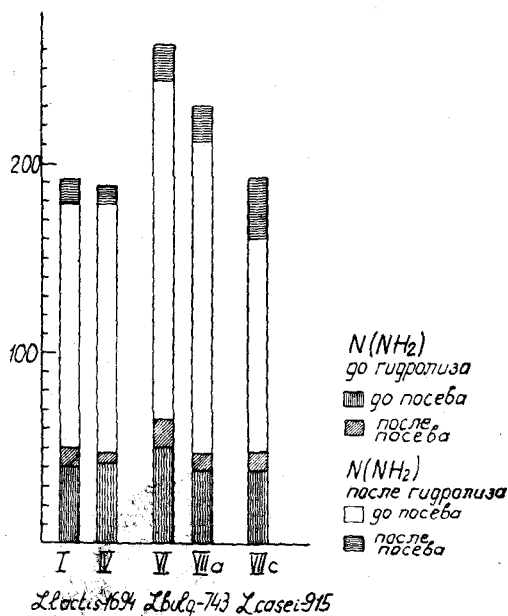


Рис. 1. Содержание аминного азота в культуральной среде перед посевом и после посева с разными штаммами рода *Lactobacterium*.

Полученные данные показывают, что наибольшая часть $N(NH_2)$ культуральной среды представлена в виде пептидных и белковых соединений, расщепляемых режимами, установленными для их гидролиза. Это наглядно видно по степени возрастания в среде перед посевом от-

ношения $\frac{N(NH_2) \text{ после гидролиза}}{N(NH_2) \text{ до гидролиза}} \times 100$, величина которого колеблется в пределах 4,27—5,55%. Кроме того, среда содержит азотистые соединения неаминной природы, что определяется по разнице между **общим** N и $N(NH_2)$ после гидролиза.

В процессе выращивания у всех 3-х видов бактерий **общий** и **аминный** формы азота среды (после гидролиза) не уменьшаются, а наоборот, несмотря на поглощение растущей культурой значительных количеств азота, эти формы проявляют тенденцию к некоторому увеличению, происходящему, как указывает проведенный баланс, в основном за счет NH_2 —азота.

Сравнение концентраций $N(NH_2)$ в среде до гидролиза перед посевом и после выращивания культуры выявляет незначительное изменение, свидетельствующее о весьма слабой протеолитической активности молочнокислых бактерий в условиях проведенных опытов.

2. Аминокислоты культуральной среды и изменение их состава при выращивании молочнокислых бактерий. Изучено количество отдельных аминокислот в среде перед посевом и после роста исследуемой культуры до и после гидролиза. Количество отдельных аминокислот, выраженных в мг в 100 мл среды, дает не только характеристику питательной среды, но также отражает степень вовлечения аминокислот в пептидные и т. п. соединения (рис. 2).

Данные показывают, что наибольшая доля всех аминокислот вовлечена в пептидные соединения, расщепленные после кислотного гидролиза. Некоторые из них—аргинин, фенилаланин, лейцин—изолейцин—находятся в среде в свободном состоянии в большем количестве, чем другие, но их доля не превышает 10—20% суммарного количества всех аминокислот.

В процессе роста культуры происходит также увеличение доли отдельных аминокислот. Относительно больше повышается доля лейцина и глутаминовой кислоты, валина-метионина у штамма 915, треонина, аланина, глутаминовой кислоты у шт. 1694, лизина-гистидина, аспарагиновой, глутаминовой кислот, пролина у шт. 743.

Определено общее количество всех аминокислот исходной и культуральной среды после кислотного гидролиза (табл. 2, рис. 2). Данные показывают, что в процессе выращивания бактерий происходит некоторое увеличение суммы аминокислот культуральной среды, особенно у штаммов 743 и 1694, и в меньшей степени (и не постоянно)—у шт. 915.

Прибавление к аминокислотам среды, аминокислот, накопленных в биомассе, показывает положительный баланс суммы по сравнению с исходной средой.

Баланс общего и аминного азота в процессе выращивания молочнокислых бактерий. Путем сравнения количеств общего и аминного азота, с одной стороны, в исходной среде (без посева), и с другой—в культуре в целом (культуральная жидкость+биомасса) в конце цикла роста был проведен баланс обеих форм азота (табл. 3).

Таблица 2

Баланс аминокислот между культуральной средой и выращиваемой в ней биомассой разных штаммов молочнокислых бактерий.

Данные выражены: для культуральной среды—в мг/в 500 мл среды, для биомассы— в % от абсолютно сухой биомассы

Амино-кислоты	АК после гидролиза		АК био-массы	Баланс АК во всем объеме среды	АК после гидролиза		АК био-массы	Баланс АК во всем объеме среды	АК после гидро-лиза		АК био-массы	Баланс АК во всем объеме среды
	до посева	после посева			до посева	после посева			до посе-ва	после посева		
L. bulgaricum—743 оп. 24.1.67					L. lactis—1694 оп. 22.2.77				L. casei—915 оп. 7.2.67			
Цис	182	191	0,9	9,9	160	187	0,2	27,2	160	139	1,3	—19,7
Лиз+Гис	318	394	8,5	84,5	335	285	8,7	—41,7	335	564	6,4	235,4
Арг	558	692	8,1	142,1	573	684	8,5	119,5	535	542	5,5	12,5
Асп	416	806	13,3	403,3	417	443	11,6	37,6	445	547	7,2	109,2
Сер	448	364	5,9	—78,1	431	570	4,9	143,9	465	368	5,5	—91,5
Гли	973	1326	7,8	360,8	993	1367	5,5	379,5	960	1028	4,8	72,8
Глу	947	1482	13,0	548,0	1006	1500	21,0	515,0	1031	1156	10,6	135,6
Тре	548	651	9,2	112,2	554	1124	8,0	578,0	651	529	5,8	—116,2
Ала	636	577	15,0	—44,0	678	1227	21,7	570,7	651	733	9,5	91,5
Про	1330	2000	5,3	675,3	1302	1232	8,4	—61,6	1302	1552	2,8	252,8
Тир	269	283	4,7	18,7	251	374	1,8	124,8	290	304	3,4	17,4
Х	328	394	3,3	69,3	301	364	1,8	64,8	304	340	3,4	39,4
Вал+Мет	286	287	7,8	8,8	258	341	3,6	86,6	289	467	4,0	182,0
Фала	423	475	0,7	52,7	431	232	4,1	—194,9	400	578	6,2	184,2
Лей+Илей	1038	1198	19,5	180,0	550	187	16,9	—346,1	1023	1356	10,3	343,3
Сумма	8710	11120	1230	2665,6	8240	10117	126,7	264,8	8841	10253	86,7	1776,1

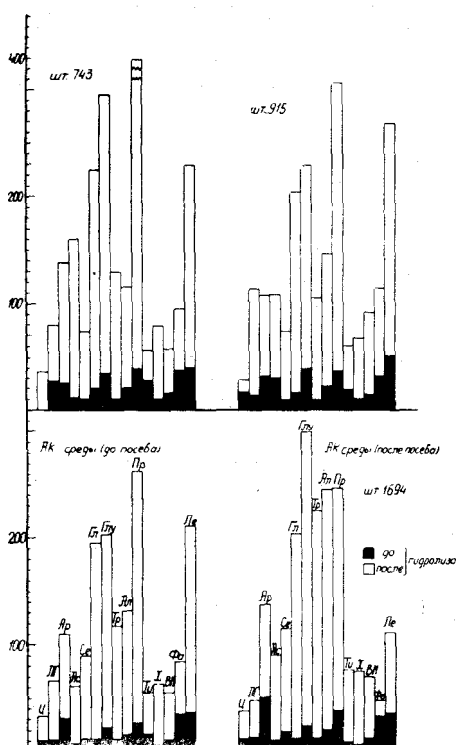


Рис. 2. Количество аминокислот в культуральной среде до и после посева разных штаммов рода *Lactobacterium*. Ц—цистеин, ЛГ—лизин+гистидин, Ар—аргинин, Ас—аспарагиновая кислота, Се—серин, Гл—глицин, Глу—глутаминовая кислота, Тр—треонин, Ал—аланин, Пр—пролин, Ти—тирозин, Х—неидентифицированное пятно, ВМ—валин+метионин, Фа—фенилаланин, Ле—лейцин+изолейцин.

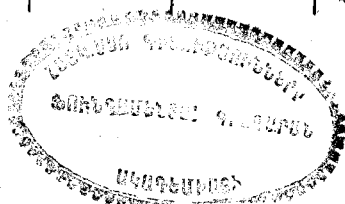
Таблица 3

Баланс общего и аминного азота инкубационной среды — 500 мл.

Данные по количеству биомассы и биомассы из работы [7]

Культуры	N в среде до опыта, мг	N в культуре после опыта			Баланс азота	
		в среде, мг	в биомассе, мг	сумма, мг	мг	%
Общий азот						
Шт. 1694	1210	1270	32,2	1302	92,2	7,6
	1131	1189	27,6	1217	85,6	7,6
Шт. 743	1127	1205	28,5	1233	106,0	9,5
	1217	1315	29,3	1345	127,8	10,4
Шт. 915	630*	648	12,9	661	30,9	4,9
	1150	1180	21,9	1202	51,9	4,5
Азот аминный после гидролиза						
Шт. 1694	895	960	21,4	981	86,4	9,7
	896	940	21,7	962	65,7	7,3
Шт. 743	1216	1310	16,5	1327	110,5	9,1
	1055	1152	19,1	1171	116,1	11,0
Шт. 915	900	961	11,5	973	71,5	7,4

* Инкубационная среда — 300 мл.



Таким образом, количество как общего, так и аминного азота в культуре в целом (биомасса + центрифугат) в конце цикла роста заметно превышает количество аналогичных форм в исходной среде перед посевом.

По количеству накопленного в культуре общего и аминного азота исследуемые штаммы располагаются в следующем убывающем порядке: *L. bulgaricum* — 743 > *L. lactis* — 1694 > *L. casei* — 915.

Из полученных результатов мы считаем особенно достоверными данные, касающиеся штаммов 743 и 915, так как в серии исследований расхождения между опытными партиями не превышали 2—3%.

Избыточный азот накопился в культуре в основном в форме NH_2 -содержащих веществ, в основном аминокислот, вероятно, и аминов и других нингидрин + соединений.

Данные по балансу азота могут быть объяснены лишь на основании фиксации атмосферного азота, свойства, до настоящего времени не известного у молочнокислых бактерий. В силу вышеизложенного считаем целесообразным выдвинуть описанное явление в качестве рабочей гипотезы, подлежащей тщательной проверке.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и лаборатория технической биохимии

Поступило 30.I 1970 г.

Մ. Ա. ՏԵՐ-ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Լ. Գ. ԱՆԱՆՅԱՆ

ԿՈՒՆՏՐՈՒՐԱԼ ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ ԱԶՈՏԱՅԻՆ ՄԻԱՅՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒՄՆԵՐԸ
LACTOBACTERIUM ՑԵՂԻ ՆԵՐԿԱՅԱՑՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ԱՃՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ներկա աշխատության նպատակն է եղել ուսումնասիրել կիսաաինթետիկ միջավայրում ընդհանուր, ամինային ազոտը և ամինաթթուները կաթնաթթվային բակտերիաների աճման ժամանակ:

Կուլտուրալ միջավայրի հիդրոլիզից պարզվել է, որ ամինային ազոտը գտնվում է պեպտիդային և սպիտակուցային միացությունների ձևով:

Հիշատակված օրգանիզմների աճման ընթացքում միջավայրի ընդհանուր և ամինային N-ը հիդրոլիզից հետո չի պակասում, այլ մի փոքր ավելանում է: Ինչպես ցույց է տալիս հաշվեկշիռը, ընդհանուր ազոտի ավելացումը կատարվում է ի հաշիվ ամինային ձևի (աղ. 1, նկ. 1):

Միջավայրի ամինային ազոտի կոնցենտրացիայի համեմատությունը մինչև հիդրոլիզը ցանքից առաջ և կուլտուրայի աճից հետո ցուցաբերում է շնչին փոփոխություն: Դա վկայում է տվյալ միկրոօրգանիզմների պրոտեոլիտիկ թույլ ակտիվության մասին:

Աճման պրոցեսում կուլտուրալ միջավայրում և առանձին, և զուամրային ամինաթթուների ավելացման տեսակետից էական տարբերություն կա կաթնաթթվային բակտերիաների ներկայացուցիչների միջև (աղ. 2, նկ. 2):

Բջիջներում կուտակված ընդհանուր և ամինային ազոտի քանակությունը կուլտուրաների միջև արտահայտվում է նվազող հերթականությամբ՝ *L. bulgaricum* — 743 > *L. lactis* — 1694 > *L. casei* — 915.

Ազոտի հաշվեկշիռը թույլատրում է առաջադրել աշխատանքային հիպոթեզ՝ կաթնաթթվային բակտերիաների կողմից մթնոլորտի ազոտի օգտագործման մասին, մի հատկանիշ, որը մինչև այժմ չի նկարագրված և որի հաստատումը պահանջում է հետազոտ հետազոտություններ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бехтерева М. Н. Микробиология, 27, 5, 560, 1958.
2. Гурович Ш. Р., Гриневич А. Г., Сафиезов Ж. Прикладная биохимия и микробиология, 3, 1, 120, 1967.
3. Красильников Н. А., Асеева И. В. V Международный биохим. конгресс, реф., 11, 38, 1961.
4. Кретович В. Л., Яковлева В. И. Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 197, 1960.
5. Рубан Е. Л. Изв. АН СССР, сер. биол., 3, 370, 1962.
6. Озолин Р. К. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 92, 1966.
7. Тер-Карапетян М. А., Ананян Л. Г. Биологический журнал Армении, 22, 5, 3, 1969.
8. Briggs M. J. J. Gen. Microbiol. 9, 234, 1953.
9. Henderson L. M., Snell E. E. J. Biol. Chem. 172, 1, 1948.
10. Kinoshita S. Adv. Appl. Microbiol. 1, 201, 1959.
11. Sharpe M. E. Dairy Sci. Abstr. 24, 3, 1962.