

57  
4-26

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР  
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

ЛИЕПИНЬ Г. К.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАРТОФЕЛЬНОГО СОКА  
В ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ СРЕДАХ  
ДЛЯ МИКРОБНОГО БИОСИНТЕЗА  
НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

096. МИКРОБИОЛОГИЯ

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

РИГА 1967

АКАДЕМИЯ НАУК ЛАТВИЙСКОЙ ССР  
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

На правах рукописи

ЛИЕПИНЬ Г. К.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАРТОФЕЛЬНОГО СОКА  
В ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ СРЕДАХ  
ДЛЯ МИКРОБНОГО БИОСИНТЕЗА  
НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

096. МИКРОБИОЛОГИЯ

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

РИГА 1967



57  
A 26

Работа выполнена в Институте микробиологии им. А. Кирхейштейна Академии наук Латвийской ССР. Научный руководитель — доктор техн. наук Бекер М. Е. Официальные оппоненты: доктор биол. наук Рубан Е. Л. и канд. технич. наук Карклинь Р. Я. Ведущее высшее учебное заведение — Биологический факультет Латвийского государственного университета имени П. Стучки.

Автореферат разослан 24 ноября 1967 г.

Защита состоится 28 декабря 1967 г. на заседании Объединенного Ученого Совета Отделения химических и биологических наук Академии наук Латвийской ССР.

Просим ознакомить специалистов с авторефератом и при-слать отзывы в двух экземплярах с подписью, заверенной печатью учреждения, по адресу:

г. Рига, ул. Тургенева, 19, Отделение химических и биологических наук АН Латвийской ССР.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке АН Латвийской ССР.

Ученый секретарь Совета, канд. с.-х. наук  
ЗАРУБИНА М. П.

*М. Зарубина*

296936

Центральная научная  
БИБЛИОТЕКА  
Академии наук Киргизской ССР

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в связи с поставленной перед народным хозяйством задачей дальнейшего развития нашей промышленности и сельского хозяйства особая роль принадлежит химическому и биохимическому синтезу. На XXIII съезде КПСС было подчеркнуто значение широкого использования микроорганизмов в народном хозяйстве как источников ферментов, витаминов, белков, аминокислот и ряда других биологически активных веществ.

За последние десятилетия в нашей стране созданы новые отрасли биопромышленности, такие, как производство органических кислот, бутанола, ацетона, ферментов, антибиотиков (Н. А. Красильников, Г. Ф. Гаузе, З. В. Ермольева, Н. Д. Иерусалимский), где используется способность микроорганизмов к очень тонкому, интенсивному биосинтезу. Организуется производство аминокислот на основе микробного биосинтеза (В. Н. Букин, С. И. Алиханян, Е. Л. Рубан, М. Е. Бекер и другие). Использование микробных метаболитов в ближайшие 10—20 лет значительно расширится.

Эффективный биосинтез тесно связан с использованием рациональных питательных субстратов. С этой целью в ряде научных учреждений нашей страны ведутся поиски новых видов сырья для микробиологической ферментации (Н. Д. Иерусалимский, С. В. Чепиго, А. Б. Лозинков и другие). Особое значение приобретает использование отходов пищевой промышленности и других непищевых видов сырья, богатых минеральными веществами, а также углерод- и азотсодержащими соединениями и специфическими ростовыми факторами.

Для изготовления полусинтетических питательных субстратов для дрожжей, актиномицетов, плесневых грибов и бактерий в промышленных условиях культивирования обычно применяют кукурузный экстракт, являющийся дешевым, уни-



версальным источником органического азота, витаминов, минеральных веществ и специфических стимуляторов роста и ферментативной активности многих микроорганизмов (Л. Л. Левитов, E. Chain, J. A. Kloss, L. A. Underkofler и другие). Однако ресурсы кукурузного экстракта — отхода кукурузно-крахмального производства — в нашей стране ограничены, при этом его приходится транспортировать за тысячи километров до места потребления. Кроме того, кукурузный экстракт как компонент полусинтетических сред не всегда обеспечивает максимальную биохимическую активность того или иного продуцента (J. Kloss, P. C. Ухольна и другие).

В настоящей работе исследована возможность использования в качестве питательного субстрата клеточного сока картофельных клубней — отхода картофельно-крахмального производства. Известно, что картофельный сок содержит ценные питательные вещества, которые стимулируют рост биомассы дрожжей, актиномицетов и плесневых грибов и активизируют их ферментативную активность (Б. Мича, М. Е. Бекер, К. И. Пазирук, Е. Нешатаева). В настоящее время основную массу этого ценнейшего продукта, ресурсы которого только в условиях Латвийской ССР составляют свыше 25 000 т в год, спускают в канализацию, тем самым загрязняя водоемы.

В отличие от кукурузного экстракта картофельный сок, кроме богатого минерального, аминокислотного и витаминного состава, в минимальных количествах содержит ряд специфических веществ — меланинов, возникающих в соке в результате окисления тирозина О-полифенолоксидазой, флорагенов — безазотистых продуктов окисления и конденсации кофениновой и хлорогеновой кислот, а также соланинов (M. Zobel, J. Schilling, E. B. Нешатаева). Количество данных соединений в картофельном соке варьирует в зависимости от сорта картофеля, условий его выращивания и хранения. В разных условиях культивирования того или иного микроорганизма упомянутые соединения могут оказывать как стимулирующий, так и тормозящий рост и ферментативную активность эффект (В. Г. Соколова, Е. В. Нешатаева).

Качество картофельного сока обуславливает также естественная микрофлора, развивающаяся в соке во время хранения и своими метаболитами изменяющая химический состав сока.

В настоящей работе изложены результаты проверки различных режимов концентрации картофельного сока (вакуумная упарка и сушка в распылительной сушилке), ана-

лиза химического состава картофельного сока, количественного анализа естественной микрофлоры, а также данные по проверке ферментативной активности нескольких микроорганизмов при культивировании их в полусинтетических картофельных средах с целью получения L-лизина и ряда антибиотиков (феноксиметилпенициллина, гризеофульвина и нистатина).

Не претендуя на исчерпывающий анализ всех сторон получения и употребления картофельного сока, мы пытались в той или иной степени обосновать те аспекты, которые определяют практическое использование этого весьма ценного продукта в микробиологической промышленности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Методика

Картофельный сок для наших исследований был получен из Алойского и Яуншагастского спиртазаводов. Сок использовали в натуральном виде, а также после концентрирования его вакуумной упаркой в разных температурных режимах (при 36, 60 и 90°) и в высушенном виде. Высушивание осуществлялось в двухступенчатой, двухкорпусной распылительной сушилке в продуктах сгорания мазута в смеси с воздухом (температура агента сушки у входа в камеру составляла 320°, в зоне сушки — 110°, температура отходящих газов — 95°).

Часть упаренного сока употребляли после хранения в течение 1 года при комнатной температуре. Вследствие метаболической деятельности естественной микрофлоры картофельный сок после хранения имел несколько измененный состав. Использовали также упаренный сок, консервированный добавками формальдегида (0,04% от содержания сухих веществ в соке).

В картофельном соке изучали: содержание сухих веществ (высушиванием сока до постоянного веса); рН (потенциометрически), количественный и качественный состав золы сока (сжиганием сока с последующими химическими и спектральными анализами золы), содержание общего и органического азота, количество летучих кислот, аминокислотный состав белков сока (путем бумажной хроматографии гидролизата сока в разделяющей системе бутиловый спирт—уксусная кислота—вода в соотношениях 5:1:1,5) и витаминный состав сока (тиамин и рибофлавин — флуорометрическим методом,



никотиновую кислоту — колориметрически, биотин и пантотеновую кислоту — микробиологическим путем с помощью ауксотрофных мутантов *Saccharomyces cerevisiae* и *Escherichia coli*).

Эффективность картофельного сока как компонента питательных субстратов была изучена путем культивирования трех продуцентов антибиотических веществ и продуцента L-лизина в полусинтетических картофельных средах. Продуцентами были выбраны два представителя плесневых грибов (*Penicillium chrysogenum*, штамм 194 — продуцент феноксиметилпенициллина и *P. nigricans*, штамм 964 — продуцент гризеофульвина), один актиномицет (*Actinomyces pursei*, штамм 153 — продуцент нистатина) и одна культура бактерии (гомосериновый мутант *Brevibacterium 22* — продуцент L-лизина). Данные продуценты выращивались на жидких полусинтетических субстратах, которые, кроме картофельного сока, содержали источники углерода и азота, а также минеральные соли и мед (в случае феноксиметилпенициллина — также феноксиуксусную кислоту), количественно и качественно соответствующие фону регламентных кукурузных сред, которые применяются в производственном биосинтезе упомянутых микробных метаболитов и которые мы использовали в качестве контрольных сред.

Культивирование продуцентов осуществляли глубинным методом в круговой качалке (объем колб — 750 см<sup>3</sup>, объем питательного субстрата — 50—100 мл, скорость вращения качалки — 220 об/мин) и в 100-литровых ферментаторах из нержавеющей стали, оборудованных турбинной мешалкой и кольцевым барботером (количество подаваемого воздуха — 1 объем на 1 объем среды в минуту, скорость вращения мешалки — 300—400 об/мин, коэффициент заполнения ферментатора — 0,6).

Во время ферментации изучали рост продуцента (определяя сухую биомассу), потребление углеводов (по методу Бертрана) и аминного азота (по методу Кьельдаля).

Количественный анализ активного метаболита осуществляли:

а) феноксиметилпенициллина — путем йодометрического титрования и чашечным методом биологического титрования, используя в качестве тест-микроба культуру *Staphylococcus aureus*;

б) гризеофульвина — спектрофотометрически;

в) нистатина — спектрофотометрически и чашечным мето-

дом биологического титрования, используя культуру *Vac: subtilis*;

г) L-лизина — методом электрофореза и биологическим методом серийного разведения, используя ауксотрофный мутант *Escherichia coli*.

## 2. Химический состав картофельного сока

Сухие вещества картофельного сока, составляющие 6—7% его объема, богаты азотсодержащими веществами (7—7,5%). По содержанию азота картофельный сок равен кукурузному экстракту (таблица 1). Зольные элементы в сухих веществах картофельного сока по общему их количеству два раза превосходят золу кукурузного экстракта, но имеют специфический состав. Доминирующими элементами являются калий (56—60%), натрий (3,3—4,2%), магний (3,1—4,6%) и кальций (4,0—4,8%). В сухих веществах картофельного сока обнаружено наличие 20 макро- и микроэлементов, количественно превосходящих их концентрацию в сухих веществах кукурузного экстракта. Исключение представляет магний, которого в кукурузном экстракте больше (таблица 2).

Таблица 1

Некоторые данные, характеризующие химический состав картофельного сока и кукурузного экстракта

Показатели	Картофельный сок			Кукурузный экстракт	
	натуральный	упаренный	высушенный	образец 1	образец 2
Содержание сухих веществ в %	6,3	42,0	87,7	52,1	51,1
Редуцирующие вещества	8,2	4,9	3,3	1,1	4,9
Зола	—	3,6	3,6	1,8	1,9
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	—	0,73	—	0,55	0,32
Общий азот	—	6,2	—	7,6	7,2
Аминный азот	—	3,1	—	3,5	3,7
Летучие кислоты в пересчете на молочную кислоту	0,05	1,8	—	1,0	1,4
Коллоидальные вещества pH	11,9	24,6	—	9,8	10,3
	6,8	4,4	—	4,4	4,2

Примечание: химический состав выражен в процентах от содержания сухих веществ.



Аминокислотный состав туберина (картофельного белка) обладает некоторой спецификой по сравнению с зерном (кукурузным белком). Наряду с изолейцином, лейцином и глютаминовой кислотой, являющимися доминирующими аминокислотами в гидролизатах как кукурузного экстракта, так и картофельного сока, последний более богат лизином, глицином и аспарагиновой кислотой, но содержит меньше аргинина и аланина.

Не наблюдалось существенной разницы при анализе аминокислотного состава туберина из трех урожаев картофеля.

По витаминному составу картофельный сок менее богат, чем кукурузный экстракт, тиаминном, биотином и рибофлавином, но равноценен ему по содержанию пантотеновой и никотиновой кислот (таблица 4). По витаминному составу сока полученные нами данные не совпадают с литературными. Б. Мица обнаружил в картофельном соке значительно больше тиамина, рибофлавина и биотина.

Таблица 2

Содержание минеральных элементов в использованных образцах картофельного сока и кукурузного экстракта

Элемент	Картофельный сок			Кукурузный экстракт	
	урожай 1962 г.	урожай 1963 г.	урожай 1964 г.	образец 1	образец 2

а) макроэлементы — в % от веса золы

Fe	1,25	1,0	0,96	0,39	0,33
Cu	0,21	0,24	0,27	0,29	0,35
Ca	4,8	4,9	4,0	2,0	2,8
Al	0,63	0,60	0,72	0,45	0,46
Mg	3,1	3,3	4,6	12,0	13,3
Na	4,2	3,9	3,3	4,9	5,8
K	60,0	56,2	60,5	49,0	42,0

б) соотношение микроэлементов

Mn	1,5	1,2	1	1	1
Si	1	1,9	2	2,1	2
Cr	2	1,6	1,2	1,2	1
Ni	2,7	2,6	1,9	1,9	2
Mo	1,4	1,5	1	1,2	1
Ba	1,1	1	1	1	1
Sr	3,8	5	5	4,5	3,1
V	0	1	1	1	1
Pb	±	±	±	±	±
Zn	±	±	±	±	±
Ag	±	±	1,2	1,4	1,2
As	±	±	0	±	±
Hg	±	±	±	±	±

Таблица 3

Содержание аминокислот в гидролизатах картофельного сока и кукурузного экстракта (в граммах аминокислот на 100 г белка)

Показатели	Картофельный сок, упаренный при 60°			Кукурузный экстракт	
	урожай 1962 г.	урожай 1963 г.	урожай 1964 г.	образец 1	образец 2
Аланин	4	4	3	8	9
Аргинин	2	2	3	5	6
Аспарагиновая кислота	12	11	11	5	6
Цистин	1	2	2	1	2
Глутаминовая кислота	9	10	11	21	19
Глицин	6	4	5	±	±
Гистидин	2	2	2	2	2
Изолейцин	15	17	15	18	17
Лейцин	10	9	9	1	2
Лизин	3	2	2	3	3
Метионин	2	2	3	5	4
Фенилаланин	9	6	7	9	8
Пролин	6	8	5	7	7
Серин	2	3	3	3	3
Треонин	5	3	5	5	5
Тирозин	2	3	3	5	5
Триптофан	6	4	6	3	3
Валин					

Таблица 4

Содержание некоторых витаминов в исследованных образцах картофельного сока и кукурузного экстракта (в мкг на 1 г сухих веществ)

Наименование витаминов	Картофельный сок, упаренный при 60°			Кукурузный экстракт	
	урожай 1962 г.	урожай 1963 г.	урожай 1964 г.	образец 1	образец 2
Тиамин	9,6	12,2	11,9	88,4	90,3
Рибофлавин	1,0	1,3	1,8	11,1	8,4
Пантотеновая кислота	55	78	72	140	92
Биотин	0,15	0,55	0,3	37	19
Никотиновая кислота	128	183	121	126	182

Возможно, что витаминный состав картофельного сока в некоторой степени зависит от микрофлоры, развивающейся при хранении сока.



### 3. Микрофлора картофельного сока

В 1 мл свежеприготовленного натурального картофельного сока содержалось 30—60 тыс. микроорганизмов, среди которых было значительное количество спорообразующих бактерий (10 000—20 000). После трехдневного хранения сока при комнатной температуре число микроорганизмов увеличилось до 10 млн. в 1 мл, но доминирующими являлись кислотообразующие (бесспорные) бактерии, число которых достигало 9 млн. в 1 мл. Количество дрожжей составляло 55 тыс. в 1 мл.

Упаренный при 60° сок непосредственно после упарки содержал около 400 тыс. живых микробных клеток в 1 мл среды, из которых около 30% составляли спорообразующие бактерии. После 10 дней хранения при комнатной температуре данный сок содержал около 900 тыс. живых микробных клеток в 1 мл субстрата, потом количество микроорганизмов постепенно снижалось и оставалось постоянным в течение 1 года на уровне 300—500 тыс. клеток в 1 мл. Микрофлора характеризовалась смешанным составом разных морфологических и физиологических групп микроорганизмов: около 65% составляли кислотообразующие бактерии, 6—8% — дрожжи, 5—8% — спорообразующие бактерии, остальные принадлежали к палочковидным и кокковым формам бактерий, сарцинам и плесневым грибам.

В упаренном при 90° соке при хранении наблюдался интенсивный рост смешанной микрофлоры, в которой на 10—15-й день хранения доминирующими стали спорообразующие бактерии (7—10 млн. в 1 мл). Интенсивное развитие микроорганизмов в данном случае объясняется тем, что упаренный при 90° сок вследствие термической коагуляции белков расслаивается на несколько фракций. В жидкой фракции субстрата наблюдается интенсивный рост спорообразующих бактерий, среди которых значительная часть принадлежит к гнилостным.

### 4. Биосинтез L-лизина в картофельной среде

В качестве продуцента L-лизина использовали гомосеринный мутант *Brevibacterium 22*, полученный из Института биохимии им. Н. Баха АН СССР. В среде, содержащей упаренный при 36 или 60° картофельный сок (или высушенный до порошкообразной консистенции сок) в концентрациях 0,5—1,0% (по содержанию сухих веществ), сернистый ам-

моний — 1,5%, мелассу — 7% (по содержанию сахаров), соли фосфорной кислоты ( $K_2HPO_4$  — 0,05% и  $KH_2PO_4$  — 0,05%) и мел — 0,5%, данный продуцент синтезировал от 18 до 22 г/л L-лизина, что соответствует уровню биосинтеза L-лизина в полусинтетической кукурузной среде аналогичного состава (табл. 5). Потребление аммиачного азота из среды и прирост биомассы продуцента в полусинтетической картофельной среде существенно не отличались от протекания этих процессов в кукурузной среде. При увеличении концентрации углеводов до 12—15% (по объему) добавлением мелассы или других углеродсодержащих органических соединений (например, гидрола, уксусной кислоты, гидролизата древесины), при соответствующем увеличении содержания сернистого аммония до 2,5—3,0%, биосинтез L-лизина в полусинтетической картофельной среде данного состава удалось повысить до 30—35 г/л при условии, что в питательном субстрате сохранялся оптимальный для биосинтеза L-лизина уровень концентрации биотина и гомосерина (5—10 мкг/л и 1000—1500 мкг/мл соответственно).

Увеличение концентрации картофельного сока до 1,5—2,0% от объема среды привело к резкому снижению биосинтеза L-лизина, что объясняется нарушением оптимальных соотношений источников углерода и азота в среде, а также, возможно, повышенной концентрацией некоторых специфических

Таблица 5  
Сравнительные данные по биосинтезу L-лизина в полусинтетических картофельных и кукурузных средах (опыты в колбах, средние данные из 5-ти повторностей)

Показатели	Кукурузный экстракт 1,5%	Картофельный сок, %		
		0,5	1,0	1,5
Концентрация L-лизина в среде (электрофорез), г/л, $\bar{x} \pm \bar{sx}$	20,2 ± 2,4	17,7 ± 2,5	18,8 ± 2,7	14,4 ± 2,0
Продолжительность роста, час	72	72	72	60
Количество остаточного сахара, %	0,005	0,1	0,1	1,1
Титр клеток, $X \cdot 10^6$ /мл	8,5	6,9	8,0	8,9
Сухая биомасса продуцента, г/л	1,01	0,72	0,82	1,02
Выход лизина на $10^6$ клеток продуцента, мг	2,4	2,5	2,4	1,4
Выход L-лизина от загруженных сахаров, %	30	25	28	21

Примечание: картофельный сок — упаренный при 60°;  $\bar{x}$  — оценка среднего значения;  $\bar{sx}$  — оценка среднего квадратичного отклонения.



Таблица 6

Биосинтез L-лизина в полусинтетической картофельной среде с разными источниками углерода (опыты в 100 л ферментаторах, средние данные 5 повторностей)

Показатели	Источник углерода, % по углероду				
	меласса, 12	меласса, 6, гидрот., 6	меласса, 6, гидрот. дрв., 6	гидролизат древесины, 12	гидрот., 12
Концентрация L-лизина в среде (электрофорез), г/л	35,1	33,2	32,8	10,1	18,1
Продолжительность роста, часы	60	60	60	72	72
Количество остаточного сахара, %	0,5	0,7	0,4	7,2	3,1
Титр клеток, $\times 10^9$ /мл	7,2	7,0	7,0	0,9	6,1

Примечание: картофельный сок — упаренный при 60° в количестве 1,0% (по содержанию сухих веществ).

ингредиентов картофельного сока, например, соланина, меланинов и др.

Аналогичные результаты получены при использовании высушенного или натурального картофельного сока, а также консервированного (путем добавок 0,04% формальдегида от содержания сухих веществ в соке) клеточного сока картофеля.

Использование упаренного при 90° картофельного сока (после хранения в течение 3—4 недель при комнатной температуре) оказалось малоэффективным. Очевидно, что гнилостные бактерии, развивающиеся в соке во время его хранения, продуктами обмена значительно ухудшили качество сока.

#### 5. Биосинтез феноксиметилпенициллина в полусинтетической картофельной среде

В качестве продуцента феноксиметилпенициллина использовалась высокопродуктивная культура *Penicillium chrysogenum*, штамм 194. Ферментация продуцента осуществлялась на фоне регламентной кукурузной среды, применяемой на Рижском заводе медпрепаратов (модификация среды Кохила—

Мойера) с заменой кукурузного экстракта картофельным соком. Среда содержала (%) лактозу — 4, глюкозу — 1,0,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  — 0,3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,3,  $\text{MgSO}_4$  — 0,025,  $\text{MnSO}_4$  — 0,02,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  — 0,05,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  — 0,1, феноксиуксусную кислоту — 0,15, мел — 1,5, картофельный сок (в контрольных загрузках — кукурузный экстракт) — 1,0—3,0% по содержанию сухих веществ.

В полусинтетической картофельной среде данного состава биосинтез феноксиметилпенициллина достигал уровня 3750 ед/мл, что практически соответствует уровню биосинтеза данного антибиотика в кукурузной среде, однако длительность ферментации в картофельной среде на 20—24 часа больше. Увеличение цикла роста сопровождалось менее интенсивным биосинтезом антибиотика (145 ед. на 1 мг сухой биомассы продуцента, по сравнению с 225 ед/мг в кукурузной среде).

Таблица 7

Сравнительные данные по биосинтезу феноксиметилпенициллина в картофельной и кукурузной средах (опыты в колбах, средние данные 6 повторностей)

Показатели	Кукурузный экстракт, %	Картофельный сок, %		
		1	2	3
Концентрация феноксиметилпенициллина в среде (фотометрическим методом), ед./мл, $\bar{x} \pm \sigma_x$	3790 ± 148	3510 ± 205	3720 ± 156	2585 ± 132
Продолжительность роста, часы	96	96	120	144
Количество сухой биомассы, г/л	16,8	22,6	25,8	26,0
Количество остаточного сахара, %	0,55	0,10	0,30	0,05
Количество феноксиметилпенициллина на 1 мг сухой биомассы, ед.	225	149	145	95
Выход феноксиметилпенициллина в 1 мл среды за 1 час роста, ед.	39	36	31	18

Примечание:  $\bar{x}$  — оценка среднего значения;  $\sigma_x$  — оценка среднего квадратичного отклонения; картофельный сок — упаренный при 36°.



Полученные нами данные не совпадают с результатами А. Зелинки (A. Zelinka), который получил в картофельной среде аналогичного состава выход бензилпенициллина на уровне, соответствующем уровню биосинтеза данного антибиотика в кукурузной среде при одинаковой продолжительности цикла роста. Возможно, что низкая интенсивность синтеза пенициллина в картофельной среде в нашем опыте связана с недостаточной аэрацией, так как образовавшаяся биомасса продуцента в картофельной среде была более густой и мицелий мог испытывать недостаток кислорода при данных условиях аэрации. Недостаток кислорода может быть вызван не только повышенной потребностью в кислороде вследствие увеличения количества биомассы продуцента, но и уменьшенной скоростью растворения кислорода в среде при увеличении массы микроорганизма (G. Gualandl).

Максимальный выход феноксиметилпенициллина в картофельной среде был достигнут при концентрации картофельного сока 2% (по содержанию сухих веществ). Ассимиляция продуцента углеводов и сахаров из среды данного состава существенно не отличалась от ассимиляции их в кукурузной среде. Увеличение концентрации сока до 3% сопровождалось интенсивным ростом продуцента при заниженной продуктивности антибиотика (табл. 7). Не наблюдалось существенной разницы при использовании нативного, упаренного при 36—60° или высушенного картофельного сока. Упаренный при 90° сок не обеспечил нормального роста продуцента.

#### 6. Биосинтез гризеофульвина в полусинтетической картофельной среде

Производственная культура *Penicillium nigricans*, штамм 964 в среде, содержащей картофельный сок (0,5—2% по содержанию сухих веществ), источники углерода (глюкозу — 0,3% и лактозу — 2,75%), источник минерального азота (нитрат натрия — 0,3%), минеральные соли и мел, синтезировала до 1990 мкг гризеофульвина в 1 мл питательного субстрата, что на 30% превосходит уровень биосинтеза данного антибиотика в полусинтетической кукурузной среде аналогичного состава (табл. 8). Повышение уровня биосинтеза гризеофульвина в картофельной среде объясняется главным образом более интенсивным ростом биомассы продуцента, что вызвано благоприятным составом данной среды, обеспечивающим интенсивный рост мицелия и спорообразование проду-

Таблица 8

Сравнительные данные по биосинтезу гризеофульвина в картофельной и кукурузной средах (опыты в колбах, средние данные 6 повторностей)

Показатели	Кукурузный экстракт 2%	Картофельный сок, %		
		0,5	1,0	1,5
Концентрация гризеофульвина в мкг/мл среды, $\bar{x} \pm \bar{z}$	1190 ± 122	1232 ± 144	1980 ± 165	1990 ± 151
Концентрация гризеофульвина в 1 мг сухого мицелия, мкг	113	100	105	102
Продолжительность роста, часы	216	180	240	264
Количество сухой биомассы, г/л	13,2	12,5	19,1	19,6
Остаточный сахар, %	0,25	0,9	0,05	0
Выход гризеофульвина с 1 мл среды за 1 час роста, мкг	6,9	6,9	8,3	7,6

Примечание:  $\bar{x}$  — оценка среднего значения;  $\bar{z}$  — оценка среднего квадратичного отклонения.

цента. Образование плесневым грибом конидиоспор в условиях глубинного культивирования (так называемых «глубинных спор») известно сравнительно недавно (J. W. Foster, 1948).

Продуцент гризеофульвина *P. nigricans* в кукурузной среде данного состава образует лишь минимальное количество глубинных спор, которые формируются внутри мицелиальных сплетений. В полусинтетической картофельной среде продуцент образовал значительное количество свободных спор, большинство которых проросло и образовало вторичные поколения продуцента. Спорообразование в картофельной среде было еще интенсифицировано добавками карбамида (0,2% от объема среды). Карбамид как продукт распада белков и аминокислот не выделяется грибами в окружающую среду и имеет важное значение как запасное вещество, аналогично тому, как зеленые растения накапливают аминокислоты (З. И. Бекер). В тканях мицелия, особенно во время спорообразования, карбамид содержался в больших количествах (Н. И. Иванов, М. Е. Цветков). В условиях нашего эксперимента применяемый продуцент в полусинтетической картофельной среде в присутствии карбамида образовал значительные количества глубинных спор (табл. 9).

Оптимальная концентрация картофельного сока в полусинтетической среде составляет 1% по сухому веществу.



Таблица 9

Количество свободных конидиоспор в разных вариантах полусинтетических картофельных и кукурузных сред в 1 мл в разные сроки культивирования (часы)

Вариант среды	Количество свободных конидиоспор в 1 мл среды			
	72	120	198	216
Кукурузная среда	0	0	единичные споры	единичные споры
Кукурузная среда + карбамид (0,2%)	0	единичные споры	единичные споры	100
Картофельные среды: с 0,5% картофельного сока	0	единичные споры	5000	—
с 1,0% картофельного сока	0	6000	16 000	9000
с 2,0% картофельного сока	единичные споры	8000	18 000	18 000
с 1% карт. сока и 0,2% карбамида	единичные споры	12 000	86 000	22 000

Более высокий уровень концентрации сока стимулирует рост продуцента и удлиняет цикл ферментации, однако интенсивность биосинтеза антибиотика несколько снижается. В концентрации 0,5% картофельный сок также не обеспечивает максимального уровня биосинтеза гризеофульвина. Аналогичные результаты получены при использовании вместо упаренного при 60° картофельного сока сухого концентрата, а также неупаренного и консервированного добавками 0,04% формальдегида упаренного картофельного сока.

### 7. Биосинтез нистатина в полусинтетической картофельной среде

Наблюдения по биосинтезу нистатина осуществлялись при использовании продуцента *Actinomyces pursei*, штамм 153. В полусинтетической картофельной среде, содержащей (%) высушенный картофельный сок — 0,25—1,0, азотнокислый аммоний — 0,5, глюкозу или гидрол — 4 (по содержанию сахаров) и мел — 0,86, данный продуцент синтезировал нистатин в пределах от 13 до 14 тыс. ед/мл, что равняется уровню биосинтеза нистатина в полусинтетической кукурузной среде при применении лучших партий кукурузного экстракта (табл. 10).

Таблица 10

Сравнительные данные по биосинтезу нистатина в полусинтетических картофельных и кукурузной средах (опыты в 100 л ферментаторах, средние данные из 5 повторностей)

Показатели	Кукурузный экстракт, %	Картофельный сок, %		
	0,5	0,25	0,5	1
Продолжительность роста, часы	144	120	96	96
Концентрация нистатина в мицелии из 1 мл среды (спектрофотометрическим методом), ед. $\bar{x} \pm \sigma_x$	13850 ± 1110	9050 ± 920	13350 ± 1325	14050 ± 1105
Концентрация нистатина в 1 мг сухой биомассы, ед.	1860	1735	1790	1470
Количество сухой биомассы, г/л	8,1	7,4	8,9	9,4
Количество остаточного сахара, %	0,08	0,15	0	0
Выход нистатина с 1 мл среды за 1 час роста, ед.	96	75	138	145

Примечание:  $\bar{x}$  — оценка среднего значения;  $\sigma_x$  — оценка среднего квадратичного отклонения.

Продолжительность цикла роста в картофельной среде сократилась по сравнению с ростом данного продуцента в кукурузной среде, что, по-видимому, связано с оптимальным составом источников фосфора и органического азота в картофельной среде. Известно, что важнейшим условием, обеспечивающим быструю смену ростовых фаз, морфологическое и функциональное развитие мицелия, являются оптимальные источники органического азота и фосфора (Н. В. Орлова, Л. Долежилова). Условия, обеспечивающие хороший рост продуцента, могут варьировать в значительной мере в широких пределах, чем условия, определяющие интенсивный биосинтез (А. А. Прокофьева-Бельговская). Удлинение 1-й фазы роста и сокращение 2-й фазы, какими бы причинами это ни вызывалось, неизбежно сопровождается снижением продуктивности ферментации.

В полусинтетической картофельной среде указанного выше состава, содержащей 0,5% картофельного сока, наблюдалась

Центральная научная  
БИБЛИОТЕКА  
Академии наук Киргизской ССР



интенсивная ассимиляция аминокислот и углеводов при более быстром наступлении 2-й продуктивной ростовой фазы мицелия, по сравнению с ростом продуцента в кукурузной среде аналогичного состава.

Увеличение концентрации картофельного сока в среде до 1,0% снижало ферментативную активность продуцента. Увеличение биомассы мицелия в данном случае сопровождалось удлинением 1-й ростовой фазы, и тем самым снижалась ферментативная активность продуцента.

Аналогичные результаты были получены при использовании вместо высушенного упаренного при 60° картофельного сока. Упаренный при 90° сок мало эффективен.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из опыта работы экспериментального участка по получению картофельного сока на Яунпагастском спирто-крахмальном заводе видно, что при использовании действующего на картофельно-крахмальных заводах оборудования и типовых вакуум-выпарных установок, а также типовых распылительных сушилок получение концентрата картофельного сока в виде упаренной или высушенной массы клеточного сока картофельных клубней не представляет больших трудностей.

Себестоимость 1 т упаренного сока в ограниченных масштабах производства составляет 85—95 рублей, и ее можно значительно снизить при укрупненных масштабах производства. Кукурузный экстракт потребителям обходится 97 рублей за тонну, из которых около 10% составляют транспортные расходы. Использование картофельного сока экономически выгодно:

1) при реализации упаренного или высушенного картофельного сока народное хозяйство только в условиях нашей республики даст дополнительно продукцию в виде концентрата сока на сумму от 200 до 250 тыс. рублей в год;

2) наша биоиндустрия получит эффективный и дешевый вид сырья для сред микробиологического синтеза, содержащего богатый набор органического азота, минеральных веществ и витаминов;

3) уменьшится загрязнение водоемов отходами картофельно-крахмального производства;

4) железнодорожный транспорт будет освобожден от перевозки кукурузного экстракта на расстояние в тысячи километров.

По химическому составу сухой остаток картофельного сока более богат, чем сухой остаток кукурузного экстракта, минеральными веществами (за исключением магния), что благоприятствует интенсивному росту биомассы продуцентов. Согласно данным Е. И. Суриковой, А. А. Прокофьевой-Бельговской, А. Чейна и ряда других авторов, фосфор, железо и цинк в виде органических и неорганических соединений оказывают существенное влияние на ферментативную активность актиномицетов и плесневых грибов, накопление биомассы, интенсивность ассимиляции углеводов, накопление пировиноградной кислоты в среде. Фундаментальное значение фосфора в жизнедеятельности микроорганизмов связано с его участием в построении нуклеиновых кислот и значением фосфора для синтеза белков, осуществляющегося при посредстве нуклеиновых кислот, а также с его ролью как структурного элемента коферментов. Оптимальные концентрации фосфорных соединений зависят от их качественного состава, а также от композиции питательного субстрата, частично от концентрации углеводов в среде.

Аминокислотный состав картофельного сока почти не отличается от качественного состава аминокислот кукурузного экстракта, но имеет свою специфику. После гидролиза картофельного белка в картофельном соке обнаружено 18 аминокислот, среди которых доминируют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, изолейцин и лейцин. Аминокислотный состав картофельного сока как компонента питательного субстрата имеет существенное значение. Моноаминокислоты благоприятствуют росту многих актиномицетов и плесневых грибов, а основные — биосинтезу некоторых антибиотиков (Л. А. Галанина, J. Zelinka и другие). Высокая дезаминазная активность отмечена относительно гистидина, аргинина и глутаминовой кислоты (D. Gottlieb). Считается, что степень дезаминирования пропорциональна ферментативной активности актиномицетов.

В использованных нами образцах картофельного сока было обнаружено низкое содержание некоторых витаминов (биотина, рибофлавина, тиамина).

Витаминный состав картофельного сока, так же как и кукурузного экстракта, в значительной мере обуславливается микрофлорой, развивающейся в этих субстратах до упарки и во время их хранения. Некоторые микроорганизмы (молочнокислые бактерии, дрожжи) своими метаболитами (частично витаминами) улучшают качество сока и экстракта, в то время как гнилостные бактерии и плесневые грибы при массовом



размножении снижают или полностью исключают стимулирующий эффект данных субстратов.

Согласно нашим наблюдениям, правильно подобранный режим упарки (при температуре не выше 60°) и сушки обеспечивает сохранность качества концентрированного сока в течение длительного времени (более 1 года). В упаренном при 90° соке, вследствие термической коагуляции белков, наблюдается расслоение сока и в жидкой фазе развивается неблагоприятная микрофлора. Добавление формальдегида к картофельному соку (0,04% от содержания сухих веществ в соке) консервирует сок, в течение 7 дней снижает количество живых микроорганизмов до 50—100 клеток в 1 мл, не влияя при этом на рост испытанных продуцентов в питательных средах, приготовленных из формализованного сока.

Из проверенных 4 продуцентов биологически активных веществ более высокую ферментативную активность в полусинтетических картофельных средах проявили микроорганизмы, активными метаболитами которых являются внутриклеточные продукты (нистатин и гризеофульвин), продуктивность их прямо связана с ростом биомассы. Феноксиметилпенициллин и L-лизин, после синтеза выделяющиеся в питательный субстрат, одинаково интенсивно образуются как в картофельной, так и в кукурузной средах при том условии, что для интенсивного роста биомассы продуцента в картофельной среде будет подобран оптимальный режим аэрации. Отмечается интенсивное спорообразование *Penicillium nigricans*, штамм 964 в глубинных условиях культивирования в полусинтетической картофельной среде.

Из сказанного следует, что картофельный сок может успешно заменить кукурузный экстракт при микробиологическом биосинтезе ряда биологически важных веществ. На этом основании является вполне целесообразным организация выпуска картофельного сока в виде упаренного или высушенного концентрата для нужд микробиологической промышленности.

## ВЫВОДЫ

1. Нативный, упаренный и высушенный картофельный сок является эффективным стимулятором роста и ферментативной активности микроорганизмов — продуцентов L-лизина, феноксиметилпенициллина, гризеофульвина и нистатина.

2. Установлены режимы вакуумной упарки и распылительной сушки сока, при которых качество концентрата сока не снижается. Вакуумная упарка при 36—60° и распылительная сушка сока в трехкорпусной сушилке при температуре 320, 110 и 95° обеспечивают возможность хранения концентрированного картофельного сока в течение 1—2 лет без заметных изменений его стимулирующего действия. Упаренный при 90° сок без соответствующего консервирования не пригоден из-за термической коагуляции белков сока и последующего развития в жидкой фазе сока гнилостных бактерий.

3. Для микрофлоры свежеприготовленного картофельного сока характерно наличие большого количества спорообразующих бактерий. При хранении в натуральном картофельном соке доминирующими становятся кислотообразующие бактерии (80% от общего числа 10—12 · 10<sup>7</sup> микробных клеток в 1 мл субстрата). В упаренном при 36—60° соке наблюдался слабый рост смешанной микрофлоры (кислотообразующие бактерии, дрожжи, плесневые грибы и др.).

В упаренном при 90° соке происходит интенсивный рост и размножение микрофлоры, в которой на 10—15-й день хранения доминирующими становятся гнилостные бактерии.

Формалин в количестве 0,04% от содержания сухих веществ сока консервирует сок, не влияя при этом отрицательно на качество питательных субстратов, приготовленных из формализованного сока.

4. Сухой остаток картофельного сока более богат, чем кукурузный экстракт, минеральными веществами (за исключением магния). Содержание общего и аминного азота в сухом остатке картофельного сока и кукурузного экстракта практически одинаково. Амниокислотный состав картофельного сока (после гидролиза белков) своеобразен. Обнаружено присутствие 18 аминокислот, среди которых доминируют аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, изолейцин и лейцин. По содержанию витаминов использованные образцы картофельного сока менее богаты, чем кукурузный экстракт, биотином (0,15—0,58 мкг на 1 г сухих веществ сока), тиаминном (6,3—12,2 мкг/г) и рибофлавином (0,6—1,3 мкг/г). По пантотеновой кислоте (44—78 мкг/г) и никотиновой кислоте (119—214 мкг/г) картофельный сок равноценен кукурузному экстракту.

5. Гомосеринный мутант *Brevibacterium*, штамм 22 в полусинтетической картофельной среде, содержащей 1% картофельного сока (по содержанию сухих веществ), 7% ме-



лассы (по содержанию сахаров), минеральные соли, мел и биотин (10 мкг/л), обеспечивает выход внеклеточного L-лизина в размере 21—22 г/л, что соответствует уровню биосинтеза лизина в аналогичной кукурузной среде. Без искусственных добавок биотина уровень синтезированного лизина в полусинтетической картофельной среде несколько понижен (19,5 г/л), что связано с менее интенсивным ростом биомассы продуцента.

Установлено, что часть мелассы (до 50%) в полусинтетической картофельной среде можно заменить безазотистыми источниками углерода — гидролизатом древесины, гидролом и уксусной кислотой, не влияя при этом на выход L-лизина.

6. Продуцент феноксиметилпенициллина — производственный штамм *Penicillium chrysogenum* в полусинтетической среде, содержащей 2% упаренного или высушенного картофельного сока, 4% лактозы, 1% глюкозы, минеральные соли и феноксиуксусную кислоту, дает такие же выходы антибиотика, как в полусинтетической кукурузной среде аналогичного состава, однако при удлинении на 36—48 час. цикле культивирования.

7. *Penicillium pigricans*, штамм 964, выращенный в полусинтетической картофельной среде, содержащей 1% сухих веществ картофельного сока, а также лактозу (4%), минеральные соли и мел, обеспечивает выход гризеофульвина 1980 мкг/мл, что превосходит выход данного антибиотика в кукурузной среде (1190 мкг/мл). Добавление карбамида (0,2—0,4% от объема среды) стимулирует спорообразование продуцента и увеличивает выход антибиотика на 15—20%.

8. Продуцент нистатина *Actinomyces pursei*, штамм 153 в среде, содержащей 1% сухих веществ картофельного сока, глюкозу и минеральные соли, интенсивно образует биомассу и дает выход антибиотика на 10% выше при сокращении цикла роста на 20% по сравнению с культивированием данного продуцента в аналогичной кукурузной среде. Повышение эффективности ферментации в картофельной среде обеспечивается интенсивным ростом биомассы продуцента и быстрой сменой ростовых фаз.

9. При ферментации использованных агентов биосинтеза не наблюдалось существенной разницы при использовании картофельного сока из трех урожаев картофеля, а также при применении нативного, упаренного при 36—60° или высушенного картофельного сока.

## РЕКОМЕНДАЦИЯ

На картофельно-крахмальных заводах организовать производство картофельного сока в виде упаренного или сухого концентрата как компонента полусинтетических сред для нужд микробной промышленности.

## ОСНОВНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭТОЙ РАБОТЕ ОПУБЛИКОВАНЫ В СЛЕДУЮЩИХ СТАТЬЯХ:

1. Лиепиньш Г. К. «Картофельный сок как заменитель кукурузного экстракта при культивировании некоторых микроорганизмов — продуцентов физиологических веществ».

Тезисы докладов конференции «Биосинтез аминокислот витаминов и микробной биомассы 25—26 июня 1964 г.», Рига, 1964, 33—34.

2. Лиепиньш Г. К. «Культивирование продуцента L-лизина в полусинтетической среде с картофельным соком».

Материалы Второй биохимической конференции прибалтийских республик и Белорусской ССР, 15—18 сентября 1965 г. Изд. «Зинатне», Рига, 1965, 128.

3. Лиепиньш Г. К. «Ферментация пенициллина, гризеофульвина и нистатина в комплексных средах с картофельным соком».

В сб. «Продукты микробного синтеза», Рига, 1966, 203—210.

4. Лиепиньш Г. К., Арешкина Л. Я., Букин В. Н., Бекер В. Ф., Бекер М. Е., Валдман А. Р., Карклиньш Р. Я., Куцева Н. М., Раминя Л. О. Авторское свидетельство № 171727 от 30 III-65 г.



Сдано в набор 10 ноября 1967 г. Подписано в печать 16 ноября 1967 г.  
Формат бумаги 60x84<sup>1</sup>/<sub>2</sub>. Объем 1,5 листа. Тираж 300 экз. Заказ № 2424.  
Бесплатно. ЯТ 28542. Отпечатано в типографии № 1 «Циня» Управления  
полиграфической промышленности Комитета по печати при Совете Мини-  
стров Латвийской ССР, г. Рига, ул. Блаумана, 38/40.