

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА БИОСИНТЕЗ L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Д.Г. АРУТЮНЯН, А.Е. АГАДЖАНИЯН, А.А. ВАРДАНИЯН

Научно-исследовательский институт "Биотехнологии", 375056, Ереван

Биосинтез глутаминовой кислоты - температура

Бактерии *Brevibacterium flavum* часто используют при микробиологическом синтезе различных аминокислот, в данном случае и синтезе L-глутаминовой кислоты. Одним из недостатков бактерий данного рода является низкая температура роста (30-32°). В процессе синтеза аминокислот в ферментерах повышается температура, в результате чего прекращаются рост бактериальных клеток и синтез соответствующей аминокислоты. Следовательно, необходимы дополнительные энергозатраты для снижения температуры процесса до 30-32° и поддержания ее в этих пределах.

В связи с этим очевидна практическая целесообразность изучения условий ферментационного процесса, при которых бактериальные клетки будут способны синтезировать L-глутаминовую кислоту при температуре 37°.

Цель настоящей работы заключалась в оптимизации условий ферментационного процесса и определении тех компонентов питательной среды, которые обеспечивают микробиологический синтез L-глутаминовой кислоты на высоком уровне при повышении температуры процесса до 37°.

Материал и методика. Использовали культуру *Brevibacterium flavum* НИИНА-39, выделенную в Армении [1], которая в условиях колбочной ферментации при 30° в течение 48ч синтезирует 49г/л глутаминовой кислоты, 1,2г/л аланина, 0,4г/л глицина. Культуру поддерживали на мясо-пептонном агаре (МПА).

Микробиологический синтез L-глутаминовой кислоты проводили в колбах Эрленмейера объемом 250мл с 10мл среды на качалке при 240-260 об/мин. Посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера на среде следующего состава (%): сахароза - 3,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,5; KH_2PO_4 - 0,1; MnSO_4 - 0,001; MgSO_4 - 0,1; FeSO_4 - 0,001; мел - 3,0.

В процессе работы определяли глутаминовую кислоту методом бумажной хроматографии в фенольной системе [2].

Урожай бактерий определяли турбидиметрически на ФЭК М. Сухой вес биомассы устанавливали по стандартной кривой.

В предварительных опытах биосинтез глутаминовой кислоты проводили на ферментационной среде следующего состава (%): сахар - 10,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,5; KH_2PO_4 - 0,1; K_2HPO_4 - 0,1; MgSO_4 - 0,1; MnSO_4 - 0,001; FeSO_4 - 0,001; мел - 5,0; декстрин - 2мкг/л; тиамин - 600мкг/л; pH 8 [3].

Результаты и обсуждение. Для более эффективного ферментационного процесса важное значение имеет продолжительность культивирования посевного материала.

В табл.1 приведены результаты опытов, в которых исследовано влияние возраста посевного материала на продолжительность ферментации и концентрацию глутаминовой кислоты в культуральной жидкости.

Таблица 1. Влияние возраста посевного материала на продолжительность ферментации и концентрацию глутаминовой кислоты

Возраст посевного материала, ч	Продолжительность ферментации, ч	Глутаминовая кислота, г/л
8	60	38-35
12	48	48-50
16	48	48-50
20	50	40-42
24	54	40-42

Как видно, при продолжительности культивирования посевного материала от 12 до 16ч время ферментации составляет 48ч с выходом глутаминовой кислоты 48-50г/л.

Температурный режим играет важную роль как в процессе роста бактериальных клеток, так и в процессе биосинтеза. В табл.2 приведены значения оптимальной температуры биосинтеза глутаминовой кислоты.

Из приведенных данных видно, что штамм НИТИА-39 при температуре 30-32° обладает наибольшей активностью и в наиболее короткие сроки достигает стационарной фазы роста (16ч). При температуре 34-37° стационарная фаза роста достигается через 22-24ч. При 37° наблюдается снижение активности штамма, возможно, из-за увеличения продолжительности достижения стационарной фазы роста. Поэтому и дальнейшие ферментационные процессы проводили вначале при 30°, а через 16ч - при 37°.

Таблица 2. Физиологические показатели штамма-продуцента НИТИА-39 при различных температурных режимах

Температура, °С	Продолжительность ферментации, ч	Время достижения стационарной фазы роста, ч	Глутаминовая кислота, г/л
24	96	40	0
26	80	30	10
28	60	18	20
30	48	16	48
32	48	16	49
34	55	22	25
37	58	24	15

В ходе исследований было замечено, что в процессах, проходящих при 37°, при повышении концентрации сахара в ферментационной среде выход глутаминовой кислоты резко уменьшается. В табл.3 приведены данные о влиянии концентрации сахара на продолжительность ферментации и биосинтез глутаминовой кислоты.

Таблица 3. Влияние концентрации сахара на продолжительность ферментации и выход глутаминовой кислоты

Сахар, %	Продолжительность ферментации, ч	Глутаминовая кислота, г/л
6	40	30
8	44	44
10	47	35
12	50	33

Видно, что наиболее оптимальной концентрацией сахара является 8% как с точки зрения активности штамма, так и продолжительности ферментационного процесса.

Поскольку биотин играет важную роль как в процессах роста бактериальных клеток *B. flavus*, так и в синтезе глутаминовой кислоты, дальнейшую работу по оптимизации ферментационной среды для процессов, проходящих при 37°, проводили с использованием различных микродобавок дестиобиотина (табл.4).

Таблица 4. Влияние концентрации дестиобиотина на концентрацию глутаминовой кислоты в культуральной жидкости*

Дестиобiotин, мкг	Глутаминовая кислота, г/л
2	43
4	47
6	49
8	24
10	15

* Концентрация сахара в ферментационной среде 8%, продолжительность ферментации 40 ч.

Из табл.4, видно, что оптимальной концентрацией дестиобиотина является 6мкг/л.

Варьирование концентраций остальных компонентов ферментационной среды (азота, фосфора, магния, тиамин) не приводит к заметным изменениям параметров процессов, протекающих при 37°, по сравнению с таковыми при 30°.

На основании полученных результатов была составлена ферментационная среда биосинтеза глутаминовой кислоты при 37° (%): сахар - 8,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,5; KH_2PO_4 - 0,1; K_2HPO_4 - 0,1; MgSO_4 - 0,1; MnSO_4 - 0,001; FeSO_4 - 0,001; мел - 5,0; дестиобiotин - 6мкг/л; тиамин - 6мкг/л.

Длительность процесса ферментации - 40ч при температуре 37°, выход глутаминовой кислоты - 49г/л, коэффициент конверсии по сахару - 61%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян Д.Г., Кочарян Ш.М., Агаджанян А.Е., Врданян А.А., Зурабян А.С. Авт. св. N 000587 26.01.96.

2. Успенская Ж., Кротович В. Методика комплексной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот. 43, М.-Л., 1962.

Биолог. журн. Армении, 3-4 (50), 1997

УДК 547.963.32:615.277

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ПЕЧЕНИ И ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ 5-ФТОРУРАЦИЛА, МЕТОТРЕКСАТА И ДЕКСАМЕТАЗОНА

Н.В. ХУДАВЕРДЯН

*Республиканский противоопухолевый диспансер МЗ Армении, 375001, Ереван
Ереванский государственный университет, 375049*

ДНК - РНК - противоопухолевые препараты

Терапевтический эффект большинства противоопухолевых препаратов связан с подавлением или различных этапов обмена нуклеиновых кислот (НК) и прежде всего в опухолевых клетках [1-3]. В отличие от алкилирующих препаратов, которые непосредственно взаимодействуют с НК [1,4], антиметаболиты (5-фторурацил, метотрексат) нарушают их функционирование, когда в результате воздействия препарата природный компонент цепи ДНК или РНК заменяется модифицированным [5,6].

Исходя из вышесказанного, в настоящей работе были изучены количественные сдвиги ДНК и РНК в печени здоровых и опухоленосящих животных и в самой опухоли саркомы 45 (С-45) до и после воздействия 5-фторурацила, метотрексата и гормона дексаметазона при раздельном и сочетанном применении.

Материал и методика. Опыты проведены на белых беспородных крысах - самцах весом 100-120 г. Дексаметазон, 5-фторурацил и метотрексат как в отдельности, так и при сочетанном применении вводили внутривенно по методу, описанному в работах [2,3].

Результаты и обсуждение. Количественное содержание ДНК и РНК в опухолевой ткани, а также в печени здоровых крыс и крыс с С-45 до и после внутривенного применения исследуемых препаратов приведено в таблице.

Различия между образцами НК здоровых животных и с тринеоплазией С-45 обнаруживаются по их количественному содержанию в печени. У последних содержание НК несколько повышено. В самой же опухоли отмечено довольно высокое содержание как ДНК (3.45 ± 0.06), так и РНК (6.88 ± 0.05). Под влиянием изучаемых препаратов содержание НК в печени крыс с С-45 значительно уменьшается. Тот же эффект наблюдается и в опухолевой ткани, где под влиянием химиопрепаратов, особенно дексаметазона, значительно уменьшается содержание как ДНК, так и РНК.