8. *Mastrodi Salgado Jocelem, Campos T., Carvalho Paulo.* Rev. Microbiol., *11*, 2, 60-63, 1980.
9. *Mazen M.B., Abdel-Hafez S.I.I., Shaban G.M.* Acta Mycologia, *21*, 1, 109-116, 1985.
10. *Salgado J.M., Carvalho P.C.T.* Rev. Microbiol., *12*, 3, 92-95, 1981.
11. *Scott P.M., Harwig J., Blanchfield B.J.* Mycopathologia, *72*, 3, 175-180, 1980.

Поступила 15.VII.1998

Биолог. журн. Армении, 3-4 (52), 1999

УДК 579.66

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БИОСИНТЕЗА L-ПРОЛИНА

А.А. ВАРДАНЯН, К.И. АТАЯН, А.С. САГИЯН, А.С. ЗУРАБЯН

НИИ "Биотехнология", 375056, Ереван

Проведена оптимизация технологических параметров процесса биосинтеза L-пролина на различных стадиях ферментации. Показано, что одновременная оптимизация уровней таких технологических параметров, как pH, температура и коэффициент массопередачи (Kla), позволяет уточнить режимы ферментации, обеспечивающие увеличение концентрации пролина на 30-35% и коэффициента конверсии сахара на 25-30%.

Իրականացվել է L-պրոլինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական պարամետրերի օպտիմիզացիան ֆերմենտացիայի տարբեր փուլերում: Ցույց է տրվել, որ pH-ի, ջերմաստիճանի և զանգվածափոխանցման գործակցի (Kla) միաժամանակյա օպտիմիզացումը հնարավորություն է տալիս բարձրացնելու L-պրոլինի կոնցենտրացիան 30-35%-ով և շաքարի փոխակերպման գործակիցը 25-30%-ով:

The optimization of technological parameters for L-proline biosynthesis on different stages of fermentation has been realized. The stimultaneous optimization of pH, temperature and mass transfer coefficient (Kla) permits to increase the concentration of L-proline to 30-35% and the coefficient of sugar conversation to 25-30%.

L-пролин - биосинтез аминокислот - ферментация

Эффективность культивирования микроорганизмов с целью синтеза L-пролина зависит не только от выбранного продуцента, состава и соотношения компонентов питательной среды, но и от условий культивирования (технологических параметров процесса - pH; температуры и коэффициента массопередачи (Kla). Данные о влиянии pH, температуры и Kla на развитие и биосинтез пролина при использовании различных продуцентов немногочисленны, но они свидетельствуют о том, что при получении L-пролина оптимальные значения pH и температуры (t) в зависимости от вида используемого продуцента находятся в диапазоне 6,8-7,5 [1, 2, 4, 5] и 30-32° [6] соответственно. Было показано, что штаммы-продуценты пролина особенно чувствительны к недостатку кислорода [3]. Однако в литературе

отсутствуют данные относительно оптимальных значений pH, температуры и Kla на различных стадиях ферментации пролина.

В связи с этим представлялось интересным провести оптимизацию технологических параметров процесса биосинтеза L-пролина на различных стадиях ферментации.

Материал и методика. Использовали штамм-продуцент L-пролина *Brevibacterium flavum* АР-111, селекционированный в НИИ "Биотехнология". Культивирование штамма-продуцента проводили на предварительно разработанной питательной среде в лабораторных ферментерах Biostat, с рабочим объемом 7 дм^3, с автоматическим регулированием pH и температуры. L-пролин и сопутствующие аминокислоты культуральной жидкости (КЖ) определяли бумажной и тонкослойной хроматографией [3, 8]; объемный коэффициент массопередачи кислорода - методом статической дегазации [7].

Для подбора оптимального значения pH среды варьировали исходные значения его от 6,4 до 8,0, шаг варьирования 0,2, его поддерживали на постоянном уровне в течение всего процесса.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований представлены в таблицах и рисунках. Как видно из табл. 1, сравнительно высокий выход пролина наблюдается при проведении процесса ферментации при pH 6,8-7,0. Отклонение от этих значений приводит к снижению уровня синтеза пролина. Мы предполагали, что для обеспечения максимального выхода пролина необходимо регулировать pH среды постадийно на протяжении всего процесса: на стадии роста культуры (16-18 ч); стадии замедленного роста (16-22 ч); в стационарной фазе (22-56 ч). Пределы варьирования pH на указанных стадиях составили 6,4-8,0.

Таблица 1. **Зависимость синтеза пролина и сопутствующих аминокислот при фиксированных значениях pH**

pH	Содержание пролина, г/л	Суммарное содержание сопутствующих аминокислот, %	Продолжительность ферментации, ч
6,4	25±1,2	30	70-72
6,6	28±1.4	25	68-70
6,8	33±1,7	17	62-64
7,0	33±1.7	17	62-64
7,2	30±1,5	21	68-70
7,4	28±1,4	25	68-70
7,6	25±1,2	28	70-72
7,8	22±1,1	32	70-72
8,0	22±1,1	32	70-72

Исследования показали, что на стадии роста культуры значение pH среды можно варьировать в широких пределах (7,0-7,8); при этом максимальное количество биомассы (титр $3\div5\times10^{10}$ кл/мл) накапливается за 16-18 часов. На стадии замедленного роста сравнительно высокий выход пролина отмечен при pH в пределах 6,8-7,4. Большое влияние на синтез пролина, как показали исследования, оказывает значение pH в стационарной фазе (22-58 ч), оптимальным при этом оказалось значение pH 6,8-7,0. Отклонение от указанных значений приводит к снижению выхода пролина и увеличению содержания сопутствующих аминокислот.

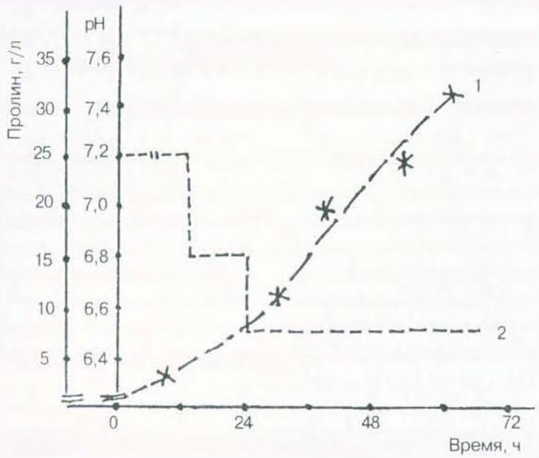

Рис. 1. Динамика биосинтеза пролина и изменения pH в питательной среде с постадийным регулированием pH. 1 - концентрация пролина; 2 - постадийное изменение pH среды при ферментации.

Таким образом, для процесса ферментации пролина определен оптимальный уровень pH-статирования, который предусматривает коррекцию pH среды с помощью 25%-ного раствора аммиака. Результаты исследований приведены на рис. 1.

Изучение влияния температуры на биосинтез пролина показало, что максимальный выход его (30-33 г/л) наблюдается при температуре 30-32°, максимальный средний удельный рост культуры (μ=0,156г$^{-1}$) при этой температуре отмечается к 14-16 часам культивирования. Понижение температуры культивирования до 26-28° отрицательно влияет на все показатели: снижается средняя удельная скорость роста культуры (μ=0,074-0,099г$^{-1}$), уменьшаются объемная продуктивность пролина (0,226-0,32 г/л час) и коэффициент конверсии сахара (23,8-27,6).

Иначе на процесс ферментации влияет повышение температуры. Ее увеличение до 34-36° благоприятно влияет на рост культуры - средняя удельная скорость μ=0,206-0,219г$^{-1}$ отмечается к 12 часам культивирования. Однако при этом резко снижаются удельная средняя активность образования пролина единицей биомассы (0,022-0,015 г/ч.б.м), объемная продуктивность пролина (0,251 г/л час), что говорит о нецелесообразности поддержания такой температуры в течение процесса. На основании полученных данных для проведения ферментации пролина нами был выбран следующий температурный режим: в течение первых 12-16 ч (фазы адаптации и логарифмического роста культуры) - 34/36° и 30/32° - с 12-16ч культивирования до конца ферментации. Влияние постадийного изменения температуры на процесс биосинтеза пролина показано на рис. 2.

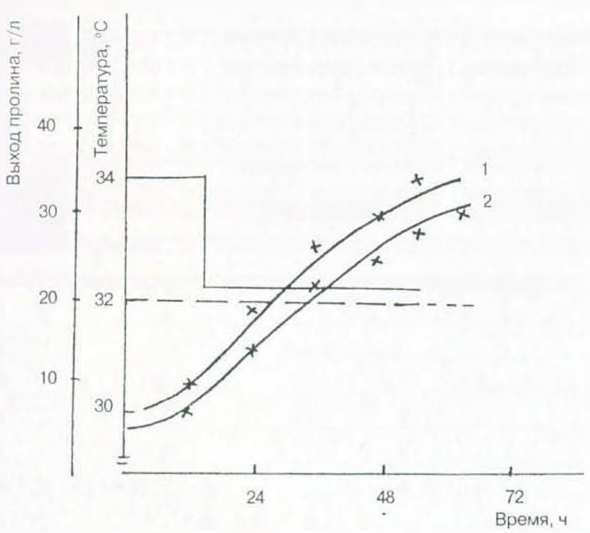

Рис. 2. Влияние постадийного изменения температуры на процесс биосинтеза L-пролина, г/л. 1 - концентрация L-пролина; 2 - концентрация пролина при температуре 32°, г/л.

Как видно из рисунка, постадийное изменение температуры позволяет сократить продолжительность процесса на 8-10 часов, что приводит к повышению производительности на 15%.

Установлено также, что для биосинтеза пролина необходима интенсивная аэрация, 4-5 г O_2/л час. С целью оптимизации процесса изучена потребность продуцента *Br.flavum* АР-111 в кислороде в различных фазах его роста. Данные о скорости потребления кислорода культурой в динамике приведены в табл. 2.

Таблица 2. **Потребление кислорода продуцентом в различных фазах его роста**

Параметры	Продолжительность культивирования, ч			
	0-9	10-20	20-35	36-64
Q(млO_2/л мин)	4.05	18.8	13.3	5.19
Kla($ч^{-1}$)	40	200	140	50

Предварительно была оценена Kla аппарата. В первой серии опытов, проведенных в условиях, обеспечивающих рассчитанные значения Kla, наблюдалось ускорение роста популяции. Однако при этом начиная с 36 ч биосинтеза замедлялась скорость накопления пролина и увеличивалось количество молочной кислоты до 16-18 г/л. Для устранения этого недостатка было экспериментально выбрано оптимальное значение Kla для последних часов роста культуры, равное 100-120$г^{-1}$, при котором происходит интенсивный биосинтез пролина, а концентрация молочной кислоты не превышает 3.0-4.5 г/л.

В результате проведенных исследований показано, что выбранные значения Kla позволяют повысить производительность процесса на 14% и снизить энергетические затраты на 35-40%.

Одновременная оптимизация уровней таких технологических параметров, как pH, температура и Kla, позволила уточнить режимы ферментации, обеспечивающие увеличение концентрации пролина на 30-35% (42,5 г/л), коэффициента конверсии сахара на 25-30%, удельную производительность на 70-80%.

Динамика процесса ферментации пролина при оптимизированных режимах pH, температуры и Kla представлена на рис. 3.

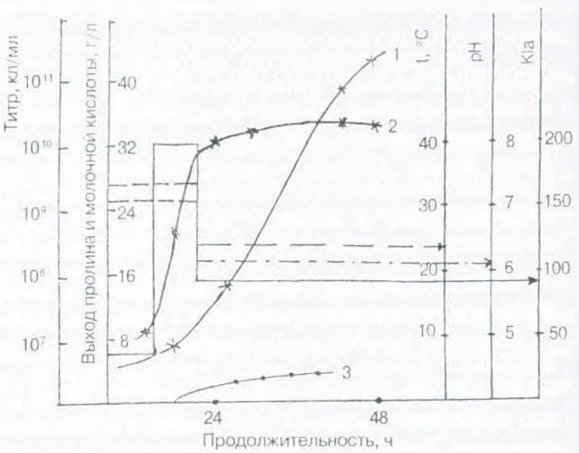

Рис. 3. Динамика процесса ферментации при оптимизированных режимах pH, температуры (t), Kla.
1 - концентрация пролина, г/л;
2 - титр культуры, кл/мл;
3 - концентрация молочной кислоты, г/л.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам (Под ред. О.Микета). 121-127, М., Мир, 1982.
2. Хроматография на бумаге. (Под ред. И.М.Хейса и К.Мацека). 445-447, М., Иностранная литература, 1962.
3. *Fang Peijmg, Mao Weiying, Chen Qi.* Acta Microbiol. Sinica, *22*, 4, 353-360, 1982.
4. Patent 154384, France, 1968.
5. Patent 3,650,899, USA, 1972.
6. Patent 3,329,577 USA, 1967.
7. *Ruchti G., Boume J.R.* 1st, Fur. Conger. Biotechnol., Interlaken, 1978. Frankfurt, 2, 101-103, 1978.
8. *Yoshinaga F., Yoshinaga S., Katsuga N.S.* Cen. Appl. Microbiology. *13*, 25-37, 1967.

Поступила 22.X.1997

Биолог. журн. Армении, 3-4 (52), 1999

УДК 579.64.58.071

КОНКУРЕНТОСПОСОБНОЕ СООБЩЕСТВО АССОЦИАТИВНЫХ ДИАЗОТРОФОВ В РИЗОСФЕРЕ ЯЧМЕНЯ

В.Г. НИКОГОСЯН, И.Б. БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучено сообщество азотфиксирующих микроорганизмов (САМ) из ризосферы ячменя, отличающееся высокой азотфиксирующей активностью, конкурентоспособностью и ростстимулирующим действием на пшеницу. Исследованное САМ А43 состоит из диазотрофов, принадлежащих к родам *Azotobacter, Bacillus, Klebsiella* и других сопутствующих бактерий. Этот состав в течение 6-летнего лабораторного хранения не изменяется. Показано, что наличие в САМ культуры *Erwinia sp.* защищает диазотрофов от окружающих конкурентов и с разной активностью подавляет рост ряда фитопатогенных бактерий.

Ուսումնասիրվել է գարու ռիզոսֆերայից մեկուսացված ազոտֆիքսող մանրէների համակեցություն (ԱՄՀ), որն օժտված է ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ, մրցունակ է և նպաստում է ցորենի սերմերի աճեցողությանը: Պարզվել է, որ փորձարկված А43 (ԱՄՀ) կազմված է *Azotobacter, Bacillus, Klebsiella* ցեղերին պատկանող դիազոտրոֆներից և նրանց ուղեկցող այլ մանրէներից: Համակեցության այդ կազմը լաբորատոր պայմաններում վեց տարիների ընթացքում պահպանվել է նույնությամբ: Ցույց է տրված, որ ԱՄՀ-ում զարգացող *Erwinia sp.*-ն դիազոտրոֆներին պաշտպանում է շրջապատի մրցակիցներից և տարբեր ակտիվությամբ ճնշում մի շարք ֆիտոպաթոգեն բակտերիաների զարգացումը:

A community of nitrogen-fixing microorganisms (CNFM) isolated from rhizosphere of barley with high nitrogen-fixing activity, the competitor stability and stimulating growth activity of wheat seeds has been studied. The community A43 consists of diazotrophs