

Биол. журн. Армении, 1-2 (59), 2007

УДК 577.112.388.2:577.151.52

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ pH ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ L-ПРОЛИНА

А.А. ВАРДАНИЯН, С.К. КЕЛЕШЯН, Ж.В. КАРАПЕТЯН,
А.Е. АГАДЖАНИЯН, А.С. САГИЯН

ЗАО "НИИ Биотехнологии" МТЭР РА, 375056, г. Ереван

Исследовали влияние pH питательной среды на биосинтез L-пролина в процессе ферментации. Определены оптимальные величины pH среды на различных фазах ферментации. На основе этого разработан способ поэтапного регулирования pH в процессе биосинтеза с использованием концентрированного раствора аммиака. Разработан новый состав ферментационной питательной среды, не содержащей карбоната кальция, определена оптимальная исходная концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в питательной среде. Показано, что отклонение значений pH и концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ от их оптимумов отрицательно сказывается на исходе процесса биосинтеза L-пролина.

Գնտազոտվել է սննդամիջավայրի pH-ի ազդեցությունը L-պրոլինի կենսասինթեզի վրա ֆերմենտացիայի ընթացքում: Որոշվել են միջավայրի pH-ի օպտիմալ արժեքները ֆերմենտացիայի տարբեր փուլերում: Ղրա հիման վրա մշակվել է ֆերմենտացիայի ընթացքում pH-ի փոփոխելու կարգավորման եղանակ, ամոնիումի խիտ լուծույթով: Մշակվել է ֆերմենտացիոն սննդամիջավայրի նոր կազմ, առանց կալցիի, որոշվել է մեկ սննդամիջավայրում $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ օպտիմալ կոնցենտրացիան: Ցույց է տրված, որ pH-ի և $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ կոնցենտրացիաների արժեքների շեղումները օպտիմալից բացասաբար են ազդում L-պրոլինի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա:

The influence of the pH of nutrient medium on the biosynthesis of L-proline during the fermentation was investigated. The optimal values of pH during different fermentation phases were determined. The method of pH regulation during the different stages of growth by concentrated ammonia solution was worked out. The composition of new fermentation medium without calcium carbonate was developed. The optimal initial concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in nutrient medium was determined. It was shown that the deviation of pH values and concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ has negative effect on the process of L-proline biosynthesis.

*Аминокислоты - L-пролин - штамм-продуцент - ферментация -
культуральная жидкость*

При глубинном культивировании штаммов-продуцентов аминокислот величина pH среды является одним из основных факторов, влияющих на рост микроорганизмов, их физиологическую и биосинтетическую активность. Подбор оптимального значения pH среды в процессе ферментации способствует проявлению максимального биосинтетического потенциала штамма-продуцента, поскольку концентрация водородных ионов в среде оказывает влияние как на активность экзогенных и эндогенных ферментных систем, так и на диссоциацию отдельных компонентов среды, повышая

степень их доступности для микроорганизмов [1, 2, 5, 6]. При этом оптимальное значение pH среды может быть разным в зависимости от стадии процесса биосинтеза.

Целью настоящей работы было изучение влияния pH среды в процессе ферментации при получении L-пролина методом микробного синтеза.

Материал и методика. В работе использовали штамм-продуцент L-пролина *Brevibacterium flavum* AP111 (*B. flavum* AP111), ВКПМ В-3258, полученный в "НИИ Биотехнологии" РА [3]. Штамм характеризуется наличием мутации аукоотрофности по изолейцину, устойчивостью к 3,4 D, L-дегидропролину и осмотическому давлению среды.

Посевной материал для засева лабораторных ферментеров выращивали в колбах Эрленмейера, емкостью 750 мл, с объемом среды 50 мл, на качалке с числом оборотов 220-240 в мин, при температуре 30-32°, в течение 16-18 ч. Ферментацию L-пролина с использованием штамма-продуцента *B. flavum* AP111 проводили на разработанной нами питательной среде [4] в лабораторных ферментерах марки Biostat S с рабочим объемом 7,0 л. Лабораторные ферментеры оснащены приборами для автоматического измерения и регулирования параметров процесса ферментации: pH среды, температуры, содержания растворенного кислорода, содержания CO₂ в отходящих газах и расхода воздуха. Процесс ферментации проводили при скорости растворения кислорода 4,0-4,5 г O₂ /л/ч, температуре 30-32°, в течение 62-68 ч.

Результаты и обсуждение. Оценка пролинсинтезирующей активности штамма-продуцента пролина *B. flavum* AP111 проводилась на ферментационной среде, содержащей 5% карбоната кальция, обеспечивающего поддержание pH в процессе ферментации в пределах 6,3-7,8.

Динамика изменения pH среды в процессе ферментации представлена на рис. 1.

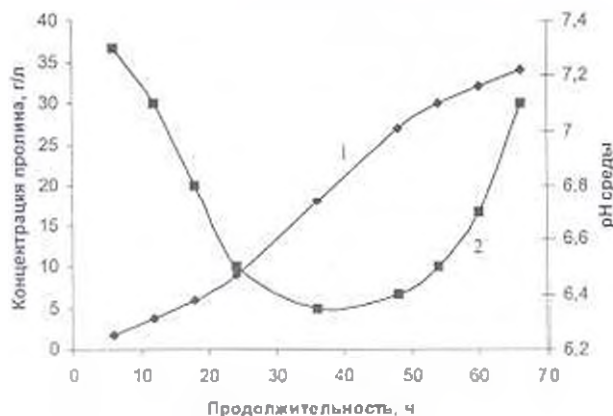


Рис. 1. Динамика изменения pH и концентрации пролина в процессе ферментации на питательной среде с 5% карбоната кальция: 1 — концентрации пролина, 2 — pH среды.

Из рис. видно, что pH среды в начальные часы роста культуры снижается до 6,3-6,5, а к концу ферментации снова повышается до 7,1-7,2. Выход пролина при этом составляет 33-35 г/л. Вместе с тем, использование для биосинтеза пролина питательной среды, содержащей карбонат кальция, приводило к значительным затруднениям при выделении и химиче-ском очистке целевого продукта из культуральной жидкости.

Поэтому возникла необходимость разработки новой технологии, основанной на применении ферментационной питательной среды, не содержащей карбоната кальция, что могло обеспечить высокий выход пролина и одновременно повысить эффективность процесса выделения и очистки целевого продукта.

В связи с этим была проведена серия экспериментов по ферментации пролина в лабораторных ферментерах на среде без карбоната кальция, с различными исходными значениями pH, а также эксперименты с постоянной корректировкой pH в процессе ферментации.

Поскольку процесс роста штамма-продуцента и биосинтеза пролина сопровождается непрерывным подкислением среды, необходимым условием для проведения ферментации на среде без карбоната кальция является постоянная подпитровка среды. В качестве титранта использовали 25%-ный раствор аммиака. Одновременно в этих же экспериментах изучалась зависимость выхода пролина от количества сульфата аммония в процессах с различными фиксированными значениями pH питательной среды. Результаты исследований представлены в табл. 1, из которой видно, что наибольший выход пролина наблюдается в случае проведения процесса ферментации при значении pH 6,8 и исходной концентрации сульфата аммония 2,5-3,0%. Отклонение значения pH и концентрации сульфата аммония от указанных величин приводит к снижению уровня синтеза пролина.

Таблица 1. Зависимость выхода пролина от концентрации сульфата аммония при фиксированных значениях pH ферментационной среды

pH	Концентрация сульфата аммония, %					
	1,0	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
	Концентрация пролина в культуральной жидкости, г/л					
6,5	12,5±0,7	14,0±0,8	18,4±1,1	17,2±1,0	16,9±1,0	17,0±1,0
6,8	14,5±0,8	18,5±1,1	25,3±1,5	26,8±1,6	23,5±1,4	21,5±1,2
7,1	12,0±0,7	12,8±0,7	20,4±1,2	19,0±1,1	17,5±1,0	17,0±1,0
7,4	10,0±0,6	12,0±0,7	19,0±1,1	19,0±1,1	17,0±1,0	15,0±0,9

Сравнительный анализ усредненных данных, характеризующих процесс ферментации пролина в лабораторных ферментерах, представлен в табл. 2.

Использование ферментационной питательной среды, не содержащей карбоната кальция с фиксированными значениями pH, не позволяет получать выход конечного продукта на уровне, наблюдаемом в процессах с карбонатом кальция. По-видимому, это объясняется тем, что в присутствии карбоната кальция уровень pH подвержен саморегуляции и имеет различные значения в зависимости от стадии культивирования, в то время как в процессах без карбоната кальция pH среды поддерживается на постоянном уровне. Поэтому было сделано предположение, что регулирование уровня pH среды постатийно, на протяжении всего процесса, может привести к повышению выхода конечного продукта. С этой целью процесс ферментации был разделен во времени на три стадии: стадия экспоненциального роста культуры (16-18 ч), стадия

замедленного роста (18-22 ч), стационарная фаза (22-68 ч). Критериями для выбора оптимальных значений pH по фазам служили: время накопления максимального титра культуры, уровень синтеза пролина, содержание сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости и продолжительность ферментации.

Таблица 2. Сравнительная характеристика процесса биосинтеза пролина на питательных средах с карбонатом кальция и без него

Основные характеристики процесса биосинтеза	Питательная среда		
	с 5,0% карбоната кальция	с 3,0% карбоната кальция	без карбоната кальция pH 6,8
Содержание пролина в культуральной жидкости, г/л	33,8±0,8	32,5±0,8	2,5±0,6
Содержание сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости, %	17,52±0,7	18,46±0,7	23,8±0,6
Производительность процесса, г/(л.ч)	0,444	0,442	0,395
Коэффициент конверсии сахара, %	30,48	30,29	24,09

* Повторность опытов 20.

На начальном этапе работы были подобраны оптимальные значения pH для стадии экспоненциального роста культуры. Было показано, что на этой стадии значение pH среды можно варьировать в широких пределах — 7,0-7,8. При этом, максимальное накопление биомассы достигается за 16-18 ч.

Для подбора оптимального значения pH на стадии замедленного роста культуры pH варьировали в пределах 6,8-8,0, а на стационарной фазе — 6,4-8,0. Было показано, что решающее влияние на синтез целевого продукта оказывает величина pH именно в процессе стационарной фазы (22-68 ч).

Из рис. 2 видно, что культивирование продуцента с постадийным регулированием pH позволяет получать концентрацию пролина в культуральной жидкости на уровне процессов с использованием питательных сред, содержащих карбонат кальция.

Таким образом, был определен оптимальный режим pH статирования для процесса ферментации пролина, который достигается доведением уровня pH до оптимального для каждой фазы значения 25%-ным раствором аммиака. Было показано, что для разных стадий процесса ферментации оптимальные значения pH значительно отличаются: для стадии экспоненциального роста — 7,3±0,1; для стадии замедленного роста — 6,9±0,1; для стационарной фазы — 6,7±0,1. Отклонения от указанных значений приводят к замедлению роста культуры, снижению выхода пролина, увеличению содержания сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости и к увеличению продолжительности ферментации.

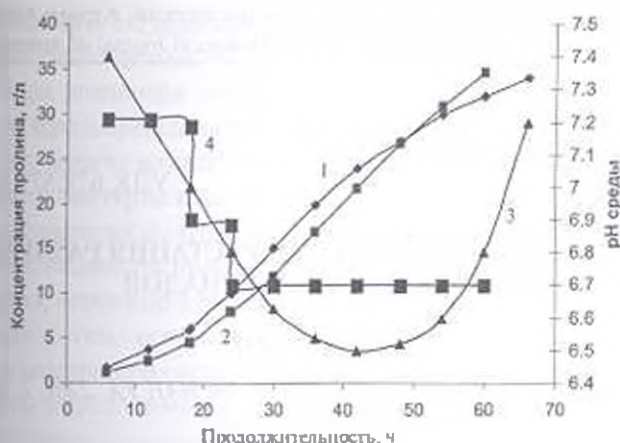


Рис. 2. Динамика биосинтеза пролина на питательной среде с карбонатом кальция без регулирования pH (1, 2) и без карбоната кальция с постоянным регулированием pH (3, 4): (1, 2) — концентрации пролина, (3, 4) — pH среды.

Культивирование штамма-продуцента на ферментационной питательной среде без карбоната кальция, с постоянным регулированием уровня pH, дает возможность получать выход конечного продукта, сравнимый с результатами процессов, проведенных с использованием карбоната кальция. При этом, содержание сульфата аммония сокращается с 5,5% до 2,5-3,0%, продолжительность ферментации — на 6-8 ч, а количество сопутствующих аминокислот — до 3-5%. Отсутствие в ферментационной среде карбоната кальция облегчает процесс сепарации культуральной жидкости на стадии отселения биомассы, повышая тем самым эффективность процесса выделения и очистки пролина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Егорова И.С. Промышленная микробиология. Под ред. И.С. Егорова. М. Высш. шк., 1989.
2. Кантерс В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств. М., Агропромиздат, 1990.
3. Качарян Ш.М., Карапетян Ж.В., Келециян С.К., Азизян А.Г., Акопян Э.М., Арушанян А.В., Амбарцумян А.А. А.С. СССР 1409659. Способ получения L-пролина. 1988.
4. Оганесян М.Г., Келециян С.К., Карабекян Б.П., Варданян А.А. А.С. СССР 778261. Питательная среда для биосинтеза L-пролина. 1980.
5. Brojn D.E., Halsted D.J. Biotechnol. and Bioengineer. 42, p.1199, 1995.
6. Detain A.L. Microbiol. Biotechnology Features, 2000.

Поступила 21.11.2007