



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 547. 538. 141: 577. 151. 52. 063. 8

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА СИНТЕЗ L-ОРНИТИНА

А.А. ВАРДАНЯН, Ф.Н. ТХРУНИ, Ц.Р. БАЛАБЕКЯН.,
А.Е. АГАДЖАНИЯН

НИИ Биотехнологии, Ереван

Исследовано влияние технологических параметров на биосинтез L-орнитина с использованием штамма-продуцента *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66, полученного методом химического мутагенеза. Определены оптимальные значения технологических параметров (pH, pO₂, t) в различных фазах ферментации. Показано, что отклонение значений от их оптимумов отрицательно сказывается на результатах процесса биосинтеза L-орнитина.

Ուսումնասիրվել է տեխնոլոգիական ցուցանիշների ազդեցությունը L-օրնիթինի կենսասինթեզի վրա, օգտագործելով քիմիական մուտագենեզով ստացված *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66 շտամ-արտադրիչը: Որոշվել են տեխնոլոգիական ցուցանիշների (pH, pO₂, t) օպտիմալ արժեքները կենսասինթեզի տարբեր փուլերում: Ցույց է տրվել, որ այդ արժեքների շեղումները օպտիմալից բացասաբար են ազդում L-օրնիթինի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա:

The effect of technological parameters on the L-ornithine biosynthesis by the *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66 has been studied. Optimum values of these technological parameters (pH, pO₂, t) on different fermentation stages have been determined. Optimum values deviations have a negative effect on the results of the L-ornithine biosynthesis process.

Штамм – продуцент – биосинтез – орнитин – ферментер

Биологические функции и фармакологическое действие отдельных свободных L-аминокислот общеизвестны. В связи с развитием орто-молекулярной медицины стало известно достаточное количество фармакологических препаратов, в состав которых входят аминокислоты и их соли, в частности, L-орнитин и его соли. Поэтому актуальными являются вопросы разработки и совершенствования технологии микробиологического способа получения L-орнитина.

Ранее для синтеза L-орнитина исследовали возможность получения мутантов, устойчивых к аргинину и гидроксалоовой кислоте у ряда микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter paraffeneus*, *Arthrobacter*

citreus, *Sacharomyces cerevisiae* [6]. Однако, как показали последующие исследования, наиболее перспективными продуцентами L-аминокислот производственного назначения являются микроорганизмы родов *Paracolibacterium*, *Corynebacterium* и *Brevibacterium* [5]. Методом химического мутагенеза нами был получен ряд мутантов вида *C. glutamicum*, ауксотрофных по аргинину и цитруллину и обладающих способностью накапливать L-орнитин в синтетической среде [1-4].

Целью данной работы являлось исследование влияния технологических параметров на синтез L-орнитина с использованием штамма-продуцента *C. glutamicum* ЦФ-66.

Материал и методика. В качестве продуцента L-орнитина использовали штамм *C. glutamicum* ЦФ-66, ауксотрофный по аргинину и цитруллину, который был получен методом химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина. Штамм-продуцент обладает также устойчивостью к стрептомицину. Для его выращивания и поддержания использовали мясопептонный агар.

В качестве жидкого посевного материала использовали суспензию, полученную путем смыва со скошенного мясопептонного агара бактерий *C. glutamicum* ЦФ-66 после выращивания в течение 18-20 ч. Определение количества биомассы (ОП) проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 ($\lambda=540$ нм, кювета №3).

Определение среднего уровня накопления L-орнитина в колбах проводили ферментацией в пяти независимых опытах на среде следующего состава, %: сахарный песок-12, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, KH_2PO_4 – 0,1, CaCO_3 – 3,0, гидролизат дрожжей – 8,0, K_2HPO_4 – 0,05, NaH_2PO_4 – 0,05, биотин – 500 мкг/л. При ферментации ауксотрофного штамма в среду добавляли расчетное количество стерильного раствора L-аргинина или дрожжевой экстракт. Стерилизацию ферментационной среды проводили при 130° , без выдержки, pH после стерилизации доводили до 7,6-7,9 40 %-ным раствором NaOH.

Биосинтез проводили в 10-литровом ферментере марки «Biostat-S» с рабочим объемом 7,0 л. Для биосинтеза использовали ферментационную среду следующего состава, %: сахарный песок – 12,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, KH_2PO_4 – 0,1, CaCO_3 – 4,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5, K_2HPO_4 – 0,05, NaH_2PO_4 – 0,05, гидролизат дрожжей – 8,0, биотин – 500 мкг/л, 0,1% пеногаситель (пропинол Б-400). Режим стерилизации ферментационной среды 125° , выдержка 30 мин, pH после стерилизации 7,4-7,6. Раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ стерилизовали отдельно при таких же условиях. Раствор биотина стерилизовали отдельно на водяной бане. Биосинтез орнитина проводили при температуре $30-32^\circ$. К объему питательной среды в количестве 7 л добавляли 4-5% посевного материала (биомасса с оптической плотностью ОП=0,13-0,15). Культивирование осуществляли при следующих условиях: скорость вращения мешалки 650 об/мин, расход воздуха 6,0 л/мин, температура $30-32^\circ$, исходный pH среды 7,4-7,6. При пенообразовании в ферментер подавали стерильный пеногаситель пропинол Б-400. Количество L-орнитина в культуральной жидкости в процессе ферментации определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Silufol” и на аминокислотном анализаторе ААА-339.

Результаты и обсуждение. Известно, что состав питательных сред существенно влияет на синтез аминокислот. Было показано, что

максимальный выход орнитина наблюдается при содержании в ферментационной среде 250-300 мкг/л аргинина. С этой целью в составе ферментационной синтетической среды использовали источники ростовых факторов, содержащих аргинин в количестве, обеспечивающем высокий выход L-орнитина. В табл.1 приведены сравнительные данные, характеризующие синтез L-орнитина штаммом-продуцентом в зависимости от использования различных источников ростовых факторов, с пересчетом на содержание L-аргинина в составе питательных сред, равном 250-300 мкг/мл.

Таблица 1. Влияние различных источников ростовых факторов в составе ферментационной среды на синтез L –орнитина в колбах

№	Ростовые факторы		L-аминокислоты, г/л					
	Наименование	Кол-во*, %	Орнитин НСІ	Сопутствующие				
				Лизин	Валин	Аланин	Глицин	%
1	Кукурузный экстракт	4±1	30±5	4±1	2±0,5	1±0,2	0,5±0,1	20
2	Гидролизат паприна (25%)	8±2	60±3	0,5±0,1	1±0,5	1,5±0,5	0,5±0,1	5,5
3	Гидролизат хлебопекарных дрожжей	10±2	43±2	4±1	1,5±0,5	1,5±0,5	0,8±0,1	15,3
4	Дрожжевой экстракт (Merck)	3±1	63±5	4±2	2,5±1	3±1	0,5±0,1	13,7

**) используемое количество ростового фактора основано на содержании в них 250-300 мкг/мл аргинина*

Как видно из приведенных экспериментальных данных, используемые источники ростовых факторов, содержащие необходимое количество аргинина, пригодны для синтеза L-орнитина, однако наблюдается различный выход сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости (лизин, валин, аланин, глутаминовая кислота, глицин). В дальнейших исследованиях использовали ферментационную питательную среду с дрожжевым экстрактом.

Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на процесс культивирования микроорганизмов в ферментере, является pH питательной среды.

В связи с этим необходимо было изучить влияние pH среды на синтез L-орнитина. Эксперименты проводили на разработанном составе

питательной среды с определенным содержанием соотношения сахара, азота и карбоната кальция, который способствует поддержанию pH в процессе ферментации в пределах 6,5-7,8. В качестве источника ростового фактора использовали дрожжевой экстракт. Учитывая то обстоятельство, что использование для биосинтеза L-орнитина питательной среды, содержащей карбонат кальция, нежелательно (так как на стадии сепарации при выделении и химочистке аминокислоты из культуральной жидкости возникают большие затруднения), биосинтез L-орнитина на питательных средах без мела проводили с различными исходными значениями pH на протяжении всего процесса. Поскольку процесс биосинтеза орнитина сопровождается непрерывным подкислением среды, в качестве титранта использовали 25%-ный раствор водного аммиака.

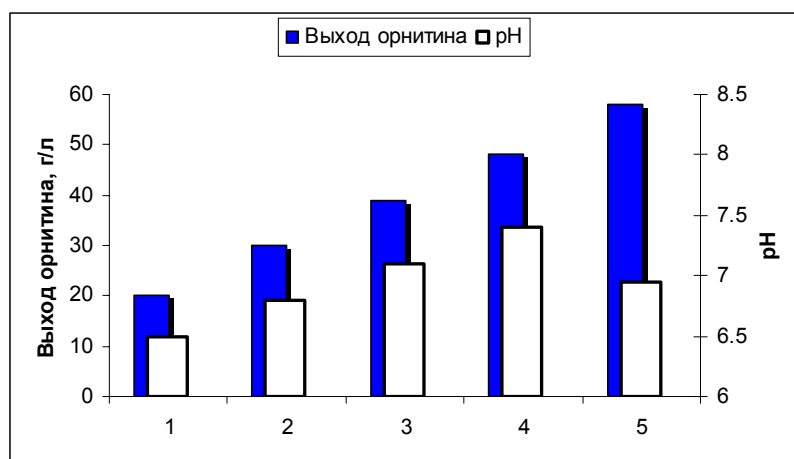


Рис.1. Зависимость синтеза орнитина от начального значения pH при ферментации в лабораторном ферментере “Biostat-S”

Результаты исследований представлены на рис.1. Как видно из рис. 1, сравнительно высокий выход L-орнитина наблюдается в процессе ферментации при начальном значении pH ферментационной среды, равном 6,8. Отклонение pH от этого значения приводит к снижению уровня синтеза орнитина. Одновременно была изучена зависимость синтеза L-орнитина от количества сульфата аммония с различными фиксированными значениями pH питательной среды. Исследования показали, что максимальный выход L-орнитина наблюдается при pH 6,8 и исходной концентрации сульфата аммония в питательной среде - 2,0%. Отклонение значений pH и содержания сульфата аммония от указанных значений приводило к снижению количества L-орнитина и повышению выхода сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости (КЖ). На

основании этого нами была рассчитана объемная продуктивность, коэффициент конверсии сахара, процентное содержание орнитина и сопутствующих аминокислот в питательных средах с мелом и без него (с фиксированным оптимальным значением pH среды). Результаты расчетов приведены в табл.2.

Таблица 2. Сравнительный анализ основных характеристик процесса биосинтеза L-орнитина в ферментере на питательных средах с мелом и без мела при фиксированном значении pH

Характеристика процесса ферментации		Содержание мела, %	
		4,0	0
1	Содержание орнитина в культуральной жидкости, %	87,45	95,31
2	Содержание сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости, %	12,44	4,68
3	Объемная продуктивность, г/л	0,75	1,05
4	Коэффициент конверсии сахара, %	32	42
5	Продолжительность ферментации, ч	72	60

Сравнение данных, представленных в табл.2, показывает, что поддержание pH среды на выбранном уровне при культивировании продуцента в питательных средах без мела позволяет получить максимальный выход орнитина при минимальном количестве сопутствующих аминокислот. Одновременно видно, что использование разработанных значений pH на практике позволяет снизить количество сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости на 8,0%, повысить объемную продуктивность L-орнитина на 30%, сократить продолжительность ферментации (биосинтеза) на 10-12ч и повысить коэффициент конверсии сахара на 10%.

С целью выявления оптимальной температуры ферментации L-орнитина были проведены эксперименты, которые показали, что максимальная удельная активность образования L-орнитина составляет 0,030 г/ч на г биомассы и наибольший выход L-орнитина (45-50 г/л) наблюдается при температуре ферментации 30-32°, а максимальная удельная скорость роста культуры (0,156 ч⁻¹) достигается к 14-16 ч культивирования. Понижение температуры культивирования до 26-28° отрицательно влияет на все показатели культивирования, так, происходит снижение удельной скорости роста культуры (0,074-0,099 ч⁻¹), уменьшение концентрации L-орнитина в КЖ до 22-35 г/л и коэффициента конверсии сахара (14-23%). Дальнейшее снижение температуры до 24° приводит к торможению роста культуры и, как следствие, к отсутствию синтеза L-орнитина. По-иному на процесс ферментации влияет повышение температуры: так, увеличение температуры до 34 - 36° увеличивает

удельную скорость роста культуры к 12ч культивирования ($0,206-0,219 \text{ ч}^{-1}$). Однако при этом происходит снижение удельной средней активности образования L-орнитина на единицу биомассы ($0,022-0,015 \text{ г/ч.г.б.м}$), выход L-орнитина составляет 24-32 г/л, коэффициент конверсии сахара 21-16%, что свидетельствует о нецелесообразности повышения температуры на всем протяжении процесса.

На основании полученных данных для проведения ферментации L-орнитина был выбран следующий температурный режим: $34-36^{\circ}$ в течение фазы адаптации и логарифмического роста культуры (до 12-15 ч) и $30-32^{\circ}$ в процессе синтеза. Ведение ферментации L-орнитина с поэтапным изменением температуры позволило сократить продолжительность процесса на 8-10 ч, что привело к повышению производительности процесса на 15%. Исходя из вышеуказанного, очевидно, что стадии роста культуры и синтеза L-орнитина должны проводиться при различных температурных оптимумах.

Для проведения исследований влияния аэрации на биосинтез L-орнитина в ферментере «Biostat» скорости растворения кислорода варьировали в пределах $1,0-4,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$. При этом определяли выход L-орнитина и сопутствующих аминокислот в зависимости от скорости растворения кислорода. Результаты экспериментов приведены в табл.3.

Таблица 3. Влияние скорости растворения кислорода на образование сопутствующих аминокислот при синтезе L-орнитина

Скорость растворения кислорода, $\text{г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$	Выход L-орнитина, г/л	Концентрация сопутствующих аминокислот, г/л			
		валин	аланин	лизин	глут. кислота
1,5	$22,0 \pm 0,3$	4,5	4,0	1,5	1,4
2,0	$33,0 \pm 0,5$	3,5	2,5	2,0	0,91
3,0	$45,0 \pm 0,8$	1,1	1,0	0,5	0,6
4,0	$25,0 \pm 0,4$	5,0	3,2	1,5	1,5
5,0	$14,0 \pm 0,1$	3,0	3,5	2,0	1,1

Как видно из полученных данных, скорость растворения кислорода оказывает существенное влияние на уровень биосинтеза L-орнитина. Было установлено, что максимальный выход L-орнитина наблюдается при скорости растворения кислорода $3,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$. Отклонение изучаемого параметра как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения отрицательно сказывается на биосинтезе L-орнитина. Так, при скорости растворения кислорода $1,5-2,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$ выход L-орнитина снижается на 52-27%. Уровень синтеза сопутствующих синтезу L-орнитина аминокислот также зависит от скорости растворения кислорода. Минимальное количество сопутствующих аминокислот образуется при скорости растворения кислорода $3,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$.

При отклонении от оптимального режима аэрации выход сопутствующих аминокислот увеличивается на 15-20%. Полученные результаты коррелируют с известными литературными данными о необходимости поддержания умеренной скорости растворения кислорода на протяжении всего процесса синтеза L-орнитина. Полученная культуральная жидкость помимо целевого продукта содержит сопутствующие аминокислоты, окрашенные компоненты, минеральные соли и другие примеси органического и неорганического характера.

Полученные результаты по изучению влияния технологических параметров ведения процесса ферментации на продуктивность штамма-продуцента L-орнитина в лабораторном ферментере позволят в перспективе осуществить масштабный переход на большие объемы промышленного оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Բալաբեկյան Ծ.Ռ., Տիրունի Ֆ.Ն., Աղաջանյան Ա.Ե. և ուրիշներ.* L-օրնիթինի մոնոհիդրոքլորիդի ստացման եղանակ: ՀՀ Արտոնագիր № 415 А 2, 1997:
2. *Տիրունի Ֆ.Ն., Բալաբեկյան Ծ.Ռ., Վարդանյան Ա.Հ., Աղաջանյան Ա.Ե., Ավագյան Յու.Ի., Սադյան Ա.Ս.* L-օրնիթինի միահիդրոքլորիդի ստացման եղանակ, ՀՀ արտոնագիր 1927 А2 15.03.2007:
3. *Агаджанян А.Е., Зурабян А.С., Оганесян Г.Ж и др.* Тезисы докл. междунар. симпозиума «Аминокислоты и их производные», Гродно, с.15, 1996.
4. *Мурадян А.Г, Акопян Э.М., Балабекян. Ц.Р., Варданын А.А., Карабеков Б.П. и др.* Способ получения L-орнитина моногидрохлорида. АС СССР 1138413 А, 1984.
5. *Chiyoda Ku.,* Amino acids and related compounds., specifications general test. Second edition (1978). Kyova Hakko Kogyo Co., CTD 1-6-1, Othemach, Tokyo, Japan; Patent CN1590367, Japan, 2005.

Поступила 04.04.2008