



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 547.538.141:577.151.52

ИЗУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПЕНОГАСИТЕЛЕЙ НА БИОСИНТЕЗ L - ОРНИТИНА

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

НИИ Биотехнологии, Ереван

Исследовано влияние различных пеногасителей на продуктивность биосинтеза L-орнитина. Отобраны наиболее эффективные пеногасители и определены оптимальные режимы их применения. Показано отрицательное действие некоторых из них на технологические показатели биосинтеза L-орнитина.

Հետազոտվել է L-օրնիթինի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա տարբեր տիպի փրփրամարիչների ազդեցությունը: Ընտրվել են բարձր արդյունավետության փրփրամարիչներ և մշակվել են դրանց կիրառման օպտիմալ ռեժիմները: Ցույց է տրվել ցածր արդյունավետության փրփրամարիչների կիրառման բացասական ազդեցությունը L-օրնիթինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական ցուցանիշների վրա:

The effect of different antifoaming agents on the L-ornithine biosynthesis productivity has been studied. The most efficient antifoaming agents have been selected, and the optimum modes of their application have been determined. The negative effect of low efficient antifoamers has been revealed upon the technological parameters of the L-ornithine biosynthesis.

Пеногаситель - пеногашение - культуральная жидкость - ферментер - ферментация - аминокислота

Процесс ферментации L-орнитина сопровождается образованием пены, интенсивность которого зависит от гидродинамических условий, состава компонентов питательной среды, продуктов метаболизма, температуры, вязкости среды, рН и других параметров. Пенообразование вызывает ряд технологических и экономических затруднений, нарушает ритмичность производственного цикла вследствие забивания пеной оборудования и коммуникаций, снижает полезную емкость ферментеров,

нарушает асептические условия. Кроме того, пенообразование существенно влияет на скорость растворения кислорода.

В литературе имеются многочисленные данные о влиянии пеногасителей на биосинтез аминокислот [1-5]. Однако такие данные практически отсутствуют для биосинтеза L-орнитина. В связи с этим актуальным является подбор эффективного пеногасителя и определение оптимального режима пеногашения.

Реализация подавления или ограничения вспенивания требует материальных затрат, однако они быстро окупаются за счет сокращения потерь целевого продукта, увеличения производственной мощности предприятия, повышения надежности технологических систем.

Материал и методика. В качестве продуцента L-орнитина использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66, ауксотрофный по аргинину и цитруллину, который был получен методом химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина. Штамм-продуцент обладает устойчивостью к стрептомицину. Выращивание и поддержание его проводили с использованием мясопептонного агара.

В качестве жидкого посевного материала использовали 16-18 - часовую культуру *C. glutamicum* ЦФ-66, выращенную в посевной среде следующего состава, %: сахарный песок - 2,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; KH_2PO_4 - 0,1; CaCO_3 - 2; гидролизат дрожжей - 4,0; K_2HPO_4 - 0,05; NaH_2PO_4 - 0,05; биотин - 500 мкг/л. Стерилизацию проводили в автоклаве при 130° , без выдержки. Значение pH после стерилизации 7,5-7,8.

Выращивание посевного материала проводили в колбах ёмкостью 750 мл с объемом среды 70 мл на круговой качалке 240 об/мин в течение 16-20 ч при 30° . В качестве инокулята использовали суспензию клеток *C. glutamicum* ЦФ-66, полученную методом смыва со скошенного мясопептонного агара после выращивания в течение 18-20 ч. Определение количества биомассы (ОП) проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 ($\lambda=540$ нм, кювета №3).

В качестве инокулята при ферментации использовали 18-часовой посевной материал бактерий *C. glutamicum* ЦФ-66 в количестве 10 % от объема ферментационной среды. Определение среднего уровня накопления L-орнитина в колбах проводили ферментацией в пяти независимых опытах на ферментационной 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. Режим стерилизации ферментационной среды проводили при 130° , без выдержки. Значение pH после стерилизации до 7,6-7,9 доводили 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; гидролизат дрожжей - 8,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,25; KH_2PO_4 - 0,1; $CaCO_3$ - 4,5; $(NH_4)_2SO_4$ - 4,5; K_2HPO_4 - 0,05; NaH_2PO_4 - 0,05; биотин-500 мкг/л. Режим стерилизации ферментационной среды 125° , выдержка 30 мин, pH после стерилизации 7,4-7,6. Раствор $(NH_4)_2SO_4$ 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 280 мл 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 $30^{\circ}-32^{\circ}$, исходный pH среды 7,4-7,6. При пенообразовании в ферментер подавали стерильный пеногаситель пропинол Б-400.

Температуру в лабораторном ферментере регулировали автоматически с точностью до $0,05^{\circ}$.

Количество L-орнитина в процессе ферментации определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках марки “Silufol” и аминокислотном анализаторе марки ААА-339.

В качестве критериев пенообразующей способности культуральной жидкости и оценки эффективности применения пеногасителей были выбраны следующие показатели:

- концентрация L-орнитина;
- пенообразующая способность культуральной жидкости (q);
- эффективность подавления пены;
- эффективный расход пеногасителя ($C_э$), обеспечивающий устранение пенообразующей способности;
- продолжительность ферментации.

Пенообразующую способность культуральной жидкости определяли по следующей формуле [3]:

$$q = H_n \cdot \tau_n / \tau_p,$$

где H_n - высота столба пены, см; τ_n - время вспенивания, ч; τ_p - время самопроизвольного разрушения пены, ч.

Результаты и обсуждение. На начальном этапе исследований изучали пенообразующую способность культуральной жидкости (КЖ) в разных фазах культивирования продуцента. На рис.1 приведены данные о вспенивании КЖ в процессе ферментации.

Как видно из графика, пенообразующая способность культуральной жидкости в процессе ферментации менялась. При отсутствии пеногасителя в составе питательной среды наблюдалось вспенивание КЖ после 10-12 ч ферментации. Максимальное пенообразование наблюдалось в конце экспоненциального роста культуры и в конце стационарной фазы продуцента. Затем пенообразующая способность КЖ снижалась до 75-80% от максимального уровня, а к 45-60 ч культивирования интенсивность пенообразования вновь возрастала и к концу ферментации достигала 90-95% по отношению к максимальному уровню.

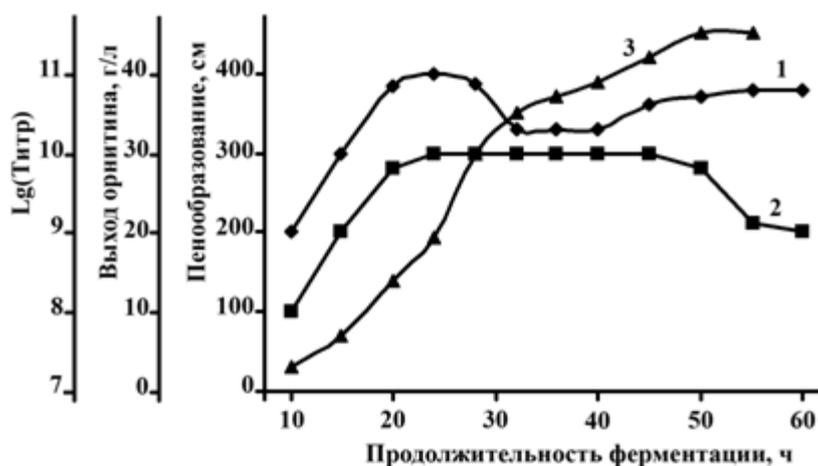


Рис. 1. Зависимость биосинтеза L-орнитина от пенообразования: 1- интенсивность пенообразования, см; 2 - титр культуры, Lg(титр); 3 - выход орнитина, г/л.

Вышеуказанные изменения свойств КЖ можно объяснить изменениями в метаболизме культуры, приводящими к выделению в среду метаболитов, способствующих пенообразованию КЖ. Кроме того, метаболиты могут влиять на физико-химические свойства КЖ и соответственно на характеристику пены. В дальнейшем с целью подбора эффективного пеногашения исследовали влияние различных поверхностно активных веществ (ПАВ), относящихся к различным химическим классам, на синтез L-орнитина. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл.1.

Таблица 1. Сравнительные оценки эффективности различных пеногасителей при синтезе L-орнитина

Пеногаситель	q, см	Концент. пеногас., %	Эффективн. пенодавления пены, %	Концентр. L-орнитина, %	Продолж. ферментации, ч	Форма внесения пеногасителя
Пеногаситель* PSL-2	480	0,1	95	90	64-68	в чистом виде
Пеногаситель* PSL-2, 1,0% водн. эмульсия	470	0,15	90	85	64-68	водн. эмульсия
Пеногаситель** SL-04-204	420	0,1	100	100	56-60	в чистом виде
Пеногаситель** SL-04-2040, 5% водн. эмульсия	400	0,25	90	95	56-60	водн. эмульсия
Антипенит FM-111	430	0,2	85	75	60-64	в чистом виде
Пропинол Б-400 10% водн. эмульсия	460	0,1	95	95	56-60	водн. эмульсия
Пропинол Б-400	450	0,2	95	95	56-60	в чистом виде
Полиметилсилоксан ПМС-200	460	0,15	85	75	68-72	в чистом виде
Полиметилсилоксан ПМС-2007	470	0,1	90	85	56-60	в чистом виде
Гидроксиметил-силоксан ПГЖ-891	420	0,2	75	70	64-68	в чистом виде
Масло подсолнечное	430	0,35	95	65	64-68	в чистом виде
Жир каштановый	450	0,3	90	60	64-68	в чистом виде
Масло соевое	400	0,4	85	65	64-68	в чистом виде
Олеиновая кислота	440	0,2	70	72	64-68	в чистом виде

* - препарат производства ЧССР; ** - препарат производства ФРГ;

o - содержание L-орнитина в культуральной жидкости составляло 52 г/л.

Приведенные в табл.1 данные показывают, что наиболее эффективным пеногасителем при ферментации L-орнитина являются препараты производства ФРГ SL-04-204 в чистом виде и 5%-ной водной эмульсии пеногасителя SL-04-204 (0,1% от объема питательной среды), а также пропинол Б 400 (Россия) и 10% - ная водная эмульсия пропинола Б-400, применение которых позволяет получить наибольший выход L-орнитина при продолжительности ферментации 56-60 ч. При применении таких пеногасителей как кашалотовый жир, подсолнечное масло, соевое масло пенообразующая способность КЖ снижалась таким же

образом, как и в случае с пеногасителем SL-04-204 и пропинола Б-400, однако эти пеногасители оказывали отрицательное влияние на биосинтетическую активность штамма-продуцента.

Экспериментально установлено, что пеногаситель необходимо добавлять после появления небольших очагов пены и подавать его непрерывно с такой скоростью, чтобы количество добавляемого за весь процесс пеногасителя не превышало допустимую эффективную концентрацию.

Таким образом, для биосинтеза L-орнитина подобран эффективный пеногаситель – SL-04-204 производства ФРГ или 5%-ная водная эмульсия пеногасителя SL-04-204, позволяющие устранить пенообразование в процессе биосинтеза L-орнитина при непрерывной его подаче, без превышения при этом допустимой эффективной концентрации (0,1%).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Варданян А.А., Анатолян Р.М.* Микробиологическая промышленность. 5, с. 2, 1983.
2. *Виестур У.Э., Долгицер Н.С.* Обзор ОНТИТЭ микробиопром с.125, 1988.
3. *Тихомиров В.К.* Пены, теория и практика их получения и разрушения. М.: Химия, с.188-242, 1988.
4. *Viesture U.E., Kristapsons M.E.* Microbes and Eng. Aspects. 12. p.169-224, 1989.
5. Patent № 5567606/ Antifoaming agent for Fermentation, L-amino acid-producing medium and production process of L-amino acid. Hayashi Masaharu., Hioki Yuichi. Japan assigned to Kao Corporation Biotechnology Advances. Vol. 15. Issue 2, p.469, 1997.

Поступила 04.04.2008