



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи  
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 3 (61), 2009

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ФЕРМЕНТАЦИИ И СОСТАВА  
ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА  
L-АРГИНИНА ШТАММОМ – ПРОДУЦЕНТОМ  
*BREVIBACTERIUM FLAVUM* НК-19А**

**А.О. КОЛОЯН, А.С. ОВСЕПЯН**

*ЗАО “НИИ Биотехнологии” МЭ РА*

Изучено влияние условий ферментации и различных концентраций компонентов ферментационной среды на процесс биосинтеза L-аргинина у полученного нами ранее штамма-продуцента *Brevibacterium flavum* НК-19А. Показано, что выход аргинина существенно зависит от влияния исследованных факторов. В результате оптимизации состава ферментационной среды и условий культивирования штамма-продуцента *Br. flavum* НК-19А выход L-аргинина удалось повысить на 96 %.

*Brevibacterium flavum – L-аргинин – штамм-продуцент – оптимизация – ферментация*

Ուսումնասիրվել է նախկինում մեր կողմից ստացված *Brevibacterium flavum* НК-19А շտամի ֆերմենտացման պայմանների և ֆերմենտացման միջավայրի բաղադրիչների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը L-արգինինի կենսասինթեզի վրա: Ցույց է տրվել, որ արգինինի ելունքը էապես կախված է հետազոտվող գործոնների ազդեցությունից: *Br. flavum* НК-19А շտամ-արտադրիչի աճեցման պայմանների և ֆերմենտացման միջավայրի օպտիմալացման արդյունքում հաջողվել է 96%-ով բարձրացնել L-արգինինի ելունքը:

*Brevibacterium flavum – L-արգինին – շտամ-արտադրիչ – օպտիմալացում – ֆերմենտացում*

The influence of fermentation conditions and different concentrations of the fermentation medium components on the process of L-arginine biosynthesis in the strain-producer *Brevibacterium flavum* НК-19А obtained by us earlier has been investigated. It was shown that the arginine yield essentially depends on the investigated factors. The optimization of the fermentation medium composition and cultivation conditions of the strain-producer *Br. flavum* НК-19А resulted in 96% increase of L-arginine yield.

*Brevibacterium flavum – L-arginine – strain-producer – optimization – fermentation*

В медицине, фармакологии, пищевой промышленности и сельском хозяйстве (особенно в животноводстве) с каждым годом возрастает потребность в различных биологически активных соединениях, в том числе аминокислотах.

Аргинин входит в состав многих терапевтических препаратов и противовирусных средств. Применяется в кардиологии и иммунологии, поскольку является источником образования окиси азота (NO) – мощного сосудорасширяющего фактора и нейромедиатора, замедляет рост доброкачественных и злокачественных опухолей, способствует заживлению ран, регулирует выработку гормонов, полезен при заболеваниях почек, играет существенную роль в лечении или предотвращении цирроза печени и т.д. Аргинин широко применяется также в сельском хозяйстве. Его добавление к кормам, наряду с лизином и метионином, способствует быстрому росту животных, повышает яйценоскость кур. Соли аргинина используются для сохранения пищевых продуктов.

Крупномасштабное получение L-аргинина основано на микробиологическом способе его производства. Сконструирован несущий ключевые гены биосинтеза L-аргинина рекомбинантный штамм-продуцент *Escherichia coli*, который за 80-90 ч ферментации продуцирует до 40 г/л L-аргинина [1], и *Serratia marcescens*, синтезирующий до 96 г/л L-аргинина за 168 ч ферментации [8].

Лучшие штаммы-продуценты, полученные “традиционными” генетико-селекционными методами из бактерий *Brevibacterium flavum* и *Corynebacterium glutamicum*, синтезируют до 36 г/л L-аргинина за 96 ч ферментации [7, 12]. Поэтому задача получения более активных штаммов-продуцентов у коринеформных бактерий, которые по своим технологическим параметрам предпочтительнее в производстве, продолжает оставаться актуальной.

Ранее мы сообщали о получении штамма-продуцента *Br. flavum НК-19А*, синтезирующего при колбочной ферментации 13 г/л L-аргинина [4].

В настоящей работе приведены результаты исследований по подбору оптимального состава ферментационной среды и условий колбочной ферментации штамма *Br. flavum НК-19А*, обеспечивающих значительное повышение выхода L-аргинина.

**Материал и методика.** В работе использован штамм *Br. flavum НК-19А*, аутоотрофный по изолейцину, чувствительный к D-серину и резистентный к аналогам - гидроксамату аргинина и тиазолаланину ( $ile^+$ ,  $D-ser^s$ ,  $ArgHx^r$ ,  $TA^r$ ). Оптимизацию состава синтетической ферментационной среды проводили по факторам роста (изолейцин, тиамин, биотин) и по основным компонентам среды (аммоний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный, магний сернокислый). С этой целью в ферментационной среде в определенных пределах варьировали концентрации указанных компонентов, а также изменяли условия проведения ферментации - pH среды, аэрацию и температуру. Результат оценивали по количеству синтезируемого аргинина в конце ферментации.

Для культивирования штаммов использовали жидкий и агаризованный мясопептонный бульон (МПБ, МПА) и минимальную среду Гловера следующего состава, %:  $NH_4Cl$  – 0,5;  $NH_4NO_3$  – 0,1;  $Na_2SO_4$  – 0,2;  $K_2HPO_4$  – 0,3;  $KH_2PO_4$  – 0,1;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,025;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001;  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 0,001; агар-“Difco” – 1,6; глюкоза – 0,8; биотин – 100 мкг/л; тиамин – 100 мкг/л; L-изолейцин – 40 мкг/мл. Для выращивания посевного материала использовали МПБ.

В качестве исходной ферментационной среды для определения аргинин-продуцирующей способности штамма использовали среду следующего состава, %: сахароза – 15,0;  $(NH_4)_2SO_4$  – 4,5;  $KH_2PO_4$  – 0,4;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,2;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,001;

$MnSO_4 \cdot 5H_2O$  – 0,001;  $CaCO_3$  – 5,0; тиамин – 300 мкг/л; биотин – 300 мкг/л; L-изолейцин – 200 мкг/мл.

Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с 14 мл ферментационной среды и 1 мл посевного материала на качалке со скоростью вращения 220-240 об/мин, при температуре 30° в течение 72 ч.

Скорость растворения кислорода определяли по описанной методике [2].

Содержание аргинина в культуральной жидкости (КЖ) определяли бумажной хроматографией в системе бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:1) или колориметрически по модифицированному методу Сакагучи [10].

Количественное определение сахара в КЖ проводили по методу Бертрана [3].

Полученные результаты обрабатывали статистически.

**Результаты и обсуждение.** Полученный нами ранее штамм-продуцент *Br. flavum* НК-19А синтезировал в исходной среде до 13 г/л аргинина [4]. Однако известно, что для выявления потенциальной синтезирующей способности продуцентов необходимо провести подбор оптимальных концентраций компонентов среды и условий ферментации [6].

С целью выбора уровня аэрации для колбочной ферментации на качалке исследовали зависимость выхода L-аргинина от объема заполнения колб исходной ферментационной средой. Результаты эксперимента приведены в табл. 1.

Как видно из табл.1, наибольшее количество синтезируемого аргинина наблюдается при объеме ферментационной среды 15 мл.

Количество синтезируемого продукта зависит также от pH ферментационной среды. В процессе интенсивного биосинтеза аргинина наблюдается значительное подкисление среды, что отрицательно влияет на выход аргинина. Для поддержания нужного оптимума pH в процессе ферментации в среду добавляется мел. В табл. 2 приведены данные, показывающие зависимость выхода аргинина от концентрации добавляемого мела.

Полученные результаты показывают, что оптимальной концентрацией мела для поддержания pH среды в течение всего процесса ферментации является 5 %. Параллельно варьировали pH среды в интервале 7,0–8,0 с шагом варьирования 0,2. Наибольший выход аргинина наблюдался при исходном pH ферментационной среды 7,6.

**Таблица 1.** Влияние уровня аэрации на выход L-аргинина у штамма *Br. flavum* НК-19А  
n = 8

Количество ферментационной среды в колбах, мл	Выход L-аргинина, г/л	Скорость растворения кислорода, г O <sub>2</sub> (л · ч)
10	9,5 ± 0,51	2,2
15	13,0 ± 0,7	1,9
20	11,7 ± 0,63	1,5
25	9,1 ± 0,49	1,2
30	6,8 ± 0,36	1,0

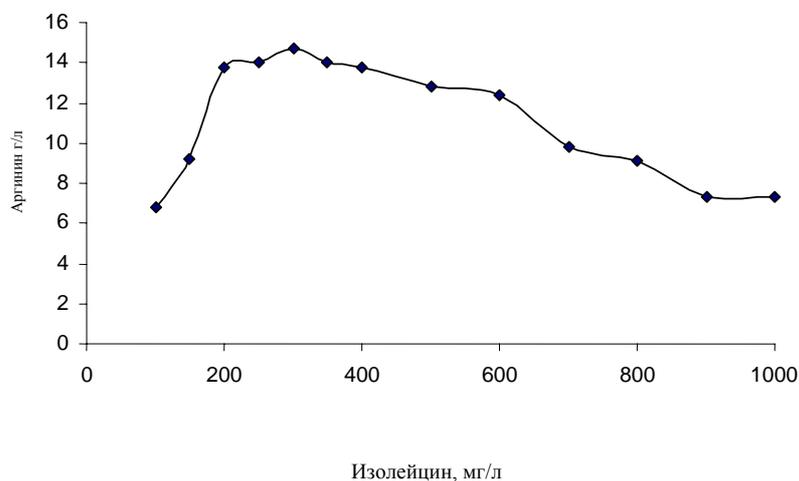
**Таблица 2.** Зависимость накопления L-аргинина от концентрации мела в ферментационной среде  
n=10

Концентрация мела, %	Выход L-аргинина, г/л	pH ферм. среды до ферментации	pH ферм. среды после ферментации
1	5,25 ± 0,28	7,6	5,1
3	10,9 ± 0,58	7,6	6,0
5	13,0 ± 0,7	7,6	7,1
6	12,5 ± 0,67	7,6	7,1

Не менее важное значение для биосинтеза аргинина имеет температурный режим процесса ферментации. Эксперименты по определению оптимальных температурных условий показали, что выход продукта больше, когда ферментация проводится при 31°. Изменение температурного режима как в сторону повышения, так и понижения приводит к снижению активности синтеза аргинина, поэтому в дальнейшем ферментации проводились при 31°.

Поскольку штамм *Br. flavum HK19A* является ауксотрофом по изолейцину, одним из важнейших компонентов питательной среды для ферментации является L-изолейцин, который добавляется в среду для обеспечения роста продуцента. Результаты, свидетельствующие о зависимости синтеза аргинина от концентрации L-изолейцина в среде, приведены в табл.3 и на рис.1.

Как видно из табл. 3 и рис. 1 оптимальная концентрация L-изолейцина составляет 300 мкг/мл. Понижение или повышение этой концентрации приводит к спаду активности синтеза аргинина.

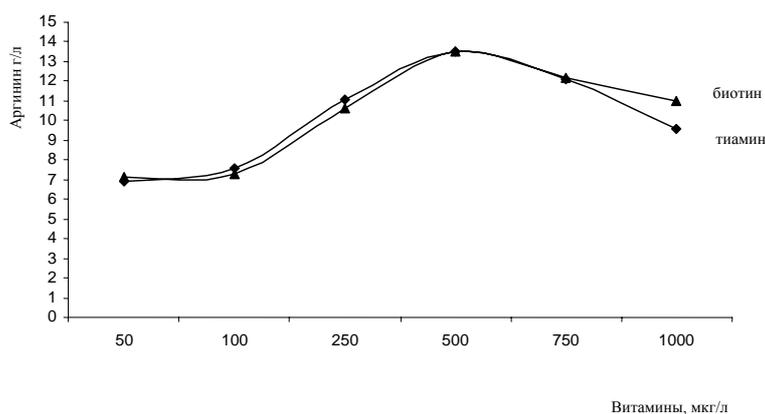


**Рис. 1.** Зависимость накопления L-аргинина от концентрации L-изолейцина в ферментационной среде.

**Таблица 3.** Зависимость накопления L-аргинина от концентрации L-изолейцина в ферментационной среде  
n = 8

Концентрация L-изолейцина, мкг/мл	Выход L-аргинина, г/л	Остаточный сахар, %
100	6,8 ± 0,36	6,4
150	9,2 ± 0,49	4,1
200	13,8 ± 0,74	2,1
250	14,0 ± 0,75	1,6
300	14,7 ± 0,79	0,4
350	14,0 ± 0,75	0,2
400	13,8 ± 0,74	0
500	12,8 ± 0,68	0
600	12,4 ± 0,66	0
700	9,8 ± 0,52	0
800	9,1 ± 0,49	0
900	7,3 ± 0,39	0
1000	7,3 ± 0,39	0

Важным фактором для биосинтеза аргинина является также наличие в ферментационной среде оптимального количества биотина. Известно, что при низких концентрациях биотина повышается проницаемость клеточной стенки по отношению к внутриклеточной глутаминовой кислоте, что приводит к снижению уровня синтеза аргинина из-за уменьшения пула предшественника. Кроме того, биотин стимулирует активность фосфоэнолпируваткарбоксилазы – фермента, имеющего важное значение для биосинтеза глутаминовой кислоты, а следовательно, и для аргинина [9, 11]. Поэтому наличие в среде биотина в сравнительно высокой концентрации является необходимым. В специальных экспериментах были определены оптимальные концентрации биотина и тиамин, который также является ростовым фактором. Результаты представлены на рис. 2, на котором видно, что наиболее высокий уровень накопления аргинина наблюдается при содержании в ферментационной среде по 500 мкг/л витаминов.



**Рис. 2.** Зависимость накопления L-аргинина от концентрации витаминов (тиамина и биотина) в ферментационной среде.

С учетом полученных результатов в дальнейшей работе по оптимизации ферментационной среды была использована синтетическая среда, содержащая, %: сахарозу – 15,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 4,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,4;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,2;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; а также L-изолейцин – 300 мкг/мл; тиамин – 500 мкг/л; биотин – 500 мкг/л. Результаты экспериментов по подбору концентрации солей (аммоний сернокислый, калий фосфорнокислый однозамещенный, магний сернокислый) приведены в табл. 4.

Как показывают полученные результаты, наибольший выход продукта обеспечивается при содержании в ферментационной среде, %:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 5,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,3 и  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1. Выход аргинина в ферментационной среде, содержащей вышеуказанные концентрации этих солей, составил 17,2 г/л.

Из литературы известно, что для синтеза многих аминокислот коринеформными бактериями немаловажную роль играют ионы металлов, в частности ионы цинка [13]. Учитывая этот факт, в ферментационную среду был добавлен  $\text{ZnSO}_4$  в концентрации 0,01%, что привело к повышению биосинтеза аргинина.

Таблица 4. Зависимость синтеза L-аргинина от концентрации солей, %, n = 7

Аммоний сернокислый ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), %	L-аргинин, г/л	Калий фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), %	L-аргинин, г/л	Магний сернокислый ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), %	L-аргинин, г/л
3,0	9,2 ± 0,49	0,1	12,2 ± 0,65	0,1	15,9 ± 0,85
4,0	12,0 ± 0,64	0,2	13,2 ± 0,71	0,2	15,5 ± 0,83
4,5	15,5 ± 0,83	0,3	16,0 ± 0,86	0,3	14,2 ± 0,76
5,0	15,5 ± 0,83	0,4	15,5 ± 0,83	0,4	13,8 ± 0,74
5,5	16,2 ± 0,87	0,5	15,1 ± 0,81	0,5	11,2 ± 0,60
6,0	13,8 ± 0,74	0,75	11,5 ± 0,61	0,75	10,0 ± 0,53
–	–	1,0	7,5 ± 0,40	1,0	8,9 ± 0,47

Как известно, наличие в ферментационной среде некоторых органических кислот (уксусная, молочная, лимонная) положительно влияет на выход конечного продукта [5]. Повышение накопления аргинина наблюдалось при добавлении в ферментационную среду натрия уксуснокислого, концентрацию которого варьировали в пределах от 0,1–0,5%. Наибольший эффект наблюдался при концентрации 0,4%. Одновременное добавление  $\text{ZnSO}_4$  – 0,01% и натрия уксуснокислого – 0,4% в ферментационную среду привело к повышению активности синтеза аргинина штаммом-продуцентом *Br. flavum* НК-19А до 22 г/л.

Исследования, проведенные нами ранее на штамме-продуценте аргинина *E. coli* LGE28, показали, что добавление в ферментационную среду рыбной пасты и дрожжевого экстракта приводит к повышению аргинин-продуцирующей способности этого штамма [1]. Исходя из этого, в разработанную нами синтетическую ферментационную среду добавляли рыбную пасту и дрожжевой экстракт в различных концентрациях. Все испытываемые концентрации последних приводили к повышению выхода конечного продукта. Оптимальной ферментационной средой, обеспечившей наибольший синтез аргинина (25,5 г/л), оказалась среда с добавлением рыбной пасты – 1,2% (табл. 5).

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволили подобрать состав ферментационной среды, а также условия проведения ферментации, обеспечивающие повышение выхода аргинина у штамма-продуцента *Br. flavum* НК-19А на 96 % по сравнению с исходным синтезом.

**Таблица 5.** Зависимость выхода L-аргинина от концентрации дрожжевого экстракта и рыбной пасты, n = 8

Дрожжевой экстракт, %	Выход L-аргинина, г/л	Рыбная паста, %	Выход L-аргинина, г/л
0	17,2 ± 0,92	0	17,2 ± 0,92
0,2	18,4 ± 0,99	0,7	23,1 ± 1,24
0,4	20,2 ± 1,08	1,2	25,5 ± 1,37
0,6	19,8 ± 1,06	1,5	23,4 ± 1,26

Предлагаемая нами ферментационная среда для биосинтеза L-аргинина имеет следующий состав, %: сахароза – 15,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 5,5; KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,3; рыбная паста – 1,2; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0,1; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0,001; MnSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O – 0,001; CaCO<sub>3</sub> – 5,0; а также L-изолейцин – 300 мкг/мл; тиамин – 500 мкг/л; биотин – 500 мкг/л; pH среды – 7,6. Продолжительность ферментации – 72 ч, температура – 31°, скорость растворения кислорода 1,9 г O<sub>2</sub> (л · ч).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Պերրիշյան Պ.Շ., Սևոյան Գ.Գ., Հովսեփյան Ա.Ա., Սարգսյան Վ.Ա., Ջուրաբյան Ա.Ա., Բրուտյան Ռ.Ա., Թովմասյան Գ.Գ. ՀՀ Արտոնագիր 29А, 1995.
2. Бабурин Л.А., Швинка Ю.Э., Виестур У.Э. Микробиологическая промышленность, 3, с.1, 1980.
3. Губен-Вейль. Методы органической химии, 2, М., Госхимиздат, с. 987, 1963.
4. Колоян А.О. Биолог. журн. Армении, 58, 1-2, с. 29-33, 2006.
5. Тхруни Ф.Н. Деп. в Арм НИИНТИ, N2, Ар-97, 1997.
6. Фадеева С.Е., Ясиновский В.Г. Биотехнология, 5, с.14-22, 2002.
7. Akashi K., Nakamura Y., Tsuchida T., Yoshii H., Ikeda S. Patent FR 2490674, 1982.
8. Chibata I., Kisumi M., Takagi T. Japan Patent 692 A, 1983.
9. Enei H., Shibai H., Hirose Y. Annu. Repts. Ferment. Processes., 5, p. 79-100, 1982.
10. Rosenberg H. Ennor A.H., Morrison J.F. Biochem J., 63, p.153-159, 1956.
11. Shio I., Otsuka s., Takanashi M. J. Biochem., 51, p. 56, 1962.
12. Tsuchida T., Ohtsuka N., Takeuchi H., Uctihori H. Japan Patent 2 186995 A., 1990.
13. Yoshinaga F., Yoshinara Y., Okumura S., Katsuya T. J. Gen. Appl. Microbiol., 13, p. 25, 1967.

Поступила 01.04.2009.