



Биол. журн. Армении, 4 (63), 2011

ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ФЕРМЕНТАЦИОННОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВАЦИИ ШТАММА *CANDIDA GUILLIERMONDII* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ D-АМИНО- КИСЛОТНОЙ ОКСИДАЗЫ С ВЫСОКИМ ВЫХОДОМ

Г.К. ГЕВОРГЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биохимии,
grigor87@mail.ru

Изучено влияние условий ферментации и различных концентраций компонентов ферментационной среды на рост микроорганизмов *Candida guilliermondii* и активность D-аминокислотной оксидазы. Было показано, что активность фермента существенно зависит от влияния исследованных факторов. В результате оптимизации состава ферментационной среды и условий культивирования штамма *C. guilliermondii* удалось получить фермент с более высокой активностью в 3-5 раз.

Оксидаза D-аминокислот – Candida guilliermondii – ферментация – оптимизация

Ուսումնասիրվել է աճեցման պայմանների ու ֆերմենտացիոն միջավայրի բաղադրիչների տարբեր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը *Candida guilliermondii* շտամի աճի ու D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ նշված ֆերմենտի ակտիվությունն էապես կախված է հետազոտվող գործոնների ազդեցությունից: Աճեցման պայմանների ու ֆերմենտացիոն միջավայրի օպտիմալացման արդյունքում հաջողվել է ստանալ 3-5 անգամ ավելի բարձր ֆերմենտային ակտիվությամբ օժտված բջջային հումոգենատ:

D-ամինաթթվային օքսիդազ – Candida guilliermondii – ֆերմենտացիա – օպտիմալացում

The influence of fermentation conditions and different concentrations of the fermentation medium components on the process of mass biosynthesis and enzyme activity in the *Candida guilliermondii* has been investigated. It was shown that microorganism growth and D-aminoacid oxidase activity depend on the investigated factors. The optimization of the fermentation medium composition and cultivation conditions of the strain *C. guilliermondii* has resulted in 3-5 fold increase of D-aminoacid oxidase activity in crude extract.

D-amino acid oxidase – Candida guilliermondii – fermentation – optimization

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, ДААО) является флавинодержущим ферментом. Она катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот в соответствующие α-кетокислоты с образованием аммиака и восстановлением молекулярного кислорода до пероксида водорода. В результате реакции образуются пероксид водорода и иминокислота. Далее иминокислота неферментативно гидро-

лизуется до α -кетокислоты и иона аммония. Этот фермент используется при получении 7-аминоцефалоспориновой кислоты из цефалоспорина С [4, 6]. Данная стадия является ключевой для синтеза полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Оксидаза D-аминокислот всл больше используется для получения небелковых L-аминокислот [12] и α -кетокислот [5], а также для детекции D-аминокислот в различных образцах как в свободной форме, так и в составе биосенсоров [7, 11, 15].

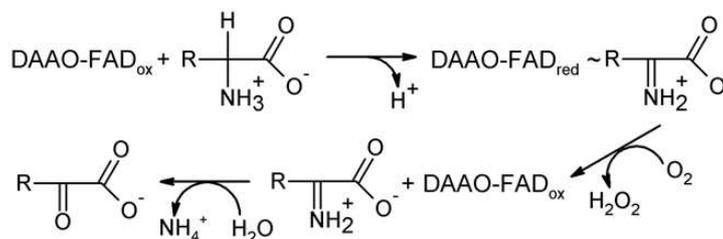


Схема действия D-аминокислотной оксидазы

Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) является наиболее перспективным для практических целей ферментом из-за своей высокой активности и стабильности по сравнению с DAAO из других источников [8, 13,14], но согласно литературным данным, уровень синтеза DAAO в природном штамме очень низкий [9]. В настоящее время лучшие штаммы-продуценты получены “традиционными” генетико-селекционными методами, с применением различных веществ в качестве индукторов [10,16]. Поэтому задача получения более активных штаммов-продуцентов у коринеформных бактерий, которые по своим технологическим параметрам предпочтительнее в производстве, продолжает оставаться актуальной.

Исходя из этого, целью настоящей работы явилось изучение, сравнение и оптимизация условий культивации штамма *C.guilliermondii* для получения большей биомассы со сравнительно высокой активностью оксидазы D-аминокислот.

Материал и методика. В работе использован штамм *C. guilliermondii* НП-4 из коллекции микроорганизмов кафедры биохимии ЕГУ.

Среды роста основывались на солевом составе (г/л), предложенном проф. Давтяном и сотрудниками: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,1; KH_2PO_4 – 1,23; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,625; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,125; NaCl – 0,125; биотин – 0,00008 (pH=5.5) [1].

Дрожжи поддерживались на косяках, содержащих 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л агарозы и вышеупомянутый состав солей. Клетки выращивались при температуре 30 °С в течение 24 ч и хранились при температуре 4 °С. С целью увеличения продукции D-аминокислотной оксидазы клетками *C. guilliermondii* исследовались следующие жидкие среды, содержащие вышеупомянутый состав солей: 1 – 10 г/л глюкоза [1]; 2 – 20 г/л глюкоза; 3 – 10 г/л глюкоза, 10г/л пептон; 4 – 10 г/л глюкоза, 10г/л дрожжевой экстракт.

Ферментацию проводили в 500 мл колбах Эрленмейера с 100 мл питательной средой на круговой качалке со скоростью вращения 200 об/мин при температуре 30 °С в течение 20 ч. Посев ферментационных сред проводили 5 %-ным инокулятом 109 суспензии клеток *C. guilliermondii*, выращенных на косяках приведенного выше состава. Клетки собирали центрифугированием, количество сухой биомассы определяли взвешиванием до постоянной массы при температуре 100 °С. Для получения ферментного препарата клетки *C. guilliermondii* обрабатывали ультразвуком в режиме 20 мин (40 циклов по 30 сек обработки и 30 сек покоя) на Ultrasonic Processor Cole Palmer при температуре 4 °С.

Количество белка определяли методом Гровса и Дейвиса.

Активность D-аминокислотной оксидазы определялась по накоплению перекиси водорода. Состав реагента: субстрат - 30 мМ (D-аланин или D-пролин), трис-HCl буфер - 50 мМ (pH=8,3), фенол - 5 мМ, 4-аминоантипирин - 0,3 мМ, пероксидаза 2 Ед/мл. После добавления раствора белка, содержащего оксидазу D-аминокислот, интенсивность окрашивания получившегося раствора измерялась спектрофотометрически при длине волн 550 нм на спектрофотометре СФ-46. За единицу ферментативной активности принималось количество фермента, катализирующего образование 1 мкмоль продукта при 37°C и pH 8,3.

Для изучения индукции D-аминокислотной оксидазы *C. guilliermondii* аминокислотами в культуральную жидкость добавляли D-формы или рацематы некоторых аминокислот в концентрациях по 100 мг/л и 200 мг/л соответственно. Для изучения влияния аэрации на выход биомассы и активность D-аминокислотной оксидазы *C. guilliermondii* клетки выращивались при вышеуказанных условиях, но при заполнении 10-100 %. Для определения зависимости выхода D-аминокислотной оксидазы *C. guilliermondii* от фазы роста стационарную культуру дрожжей десятикратно разбавляли свежей ферментационной средой и выращивали в вышеуказанных условиях, измеряя количество биомассы и активность фермента через каждые 1,5 ч в течение 12 ч ферментации.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований влияния состава культуральной жидкости на удельную активность DAAO представлены в табл. 1.

Во-первых, для сравнения с вышеупомянутыми условиями ферментации в качестве источника углерода и энергии вместо 10г/л глюкозы (контрольная группа) взяли 20 г/л глюкозы (КЖ №2); 10 г/л глюкозы + 10 г/л мясоептонного бульона (КЖ №3); 10 г/л глюкозы + 10 г/л дрожжевого экстракта (КЖ №4).

Таблица 1. Зависимость активности оксидазы D-аминокислот от состава культуральной жидкости

	Контрольная группа	КЖ № 2	КЖ № 3	КЖ № 4
1	0.0005	0.00045	0.00217	0.0028
2	0.0009	0.00135	0.00410	0.0060
3	0.0012	0.00082	0.00410	0.0048
4	0.0015	0.00115	0.00492	0.0059
5	0.0022	0.00152	0.00400	0.0050
Биомасса	9,54 г.	10,64 г.	17,36 г.	18,88 г.

1-5 - измерение активности фермента разными модификациями:
с разными субстратами (D-пролин и D-аланин в составе ферментационной среды);
разными кьюветами; с добавлением или без добавления кофермента ФАД-а

Полученные результаты показывают, что по сравнению с контрольной группой (9,54 г/л) двойная концентрация глюкозы в исходной питательной среде (КЖ №2) не приводит к существенному нарастанию биомассы (10,64 г/л), при этом активность фермента даже понижается. Однако добавление в состав жидкой питательной среды 10 г/л глюкозы + 10 г/л дрожжевого экстракта позволяет получать больше биомассы (18,88 г/л), и при этом активность фермента выше чем во всех остальных случаях.

Кроме того, было показано, что добавление ФАДа к реагенту лишь затрудняет точное определение активности фермента по интенсивности окрашивания раствора, и при этом повышение активности фермента не наблюдается.

При измерении активности фермента в составе реагента в качестве субстрата использовались D-пролин и D-аланин. Результаты в обоих случаях были сходны, однако, как известно еще из литературных данных [8], D-пролин является более хорошим субстратом для оксидазы D-аминокислот.

Также было показано, что активность D-аминокислотной оксидазы имеет наивысшие значения в течение 10-20 мин, после чего она снижается и реакция замедляется (рис. 1.)

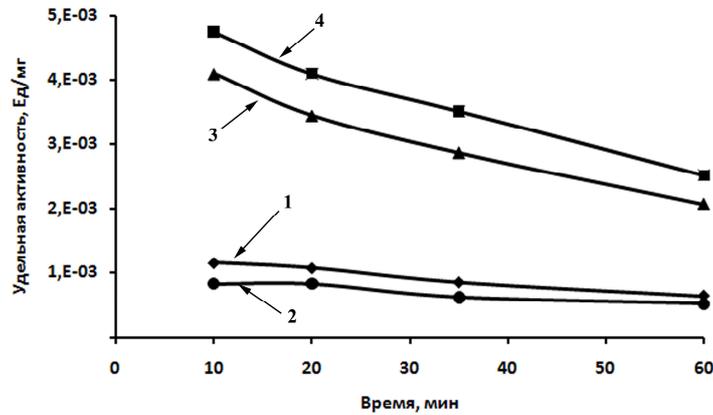


Рис. 1. Кривые зависимости активности фермента от инкубационного периода: 1. Контрольная группа, 2. КЖ №2; 3. КЖ №3, 4. КЖ №4.

С учетом полученных результатов в дальнейшей работе по оптимизации ферментационной среды и условий ферментации была использована синтетическая среда, содержащая, г/л: глюкозу -10; дрожжевого экстракта - 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3,1; KH_2PO_4 - 1,23; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,625; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,125; NaCl - 0,125; биотин - 0,00008 (рН=5.5). Также во всех последующих экспериментах было решено для определения ферментативной активности в состав реагента в качестве субстрата использовать D-пролин, не использовать ФАД, измерять активность фермента в течение первых 10-20 мин.

Также важным фактором для нарастания биомассы является наличие в ферментационной среде оптимального количества биотина. Известно, что при низких его концентрациях повышается проницаемость клеточной стенки по отношению к внутриклеточной глутаминовой кислоте [2]. Кроме того, биотин стимулирует активность фосфоэнолпируваткарбоксилазы – фермента, имеющего важное значение для биосинтеза глутаминовой кислоты. Но количество биотина в составе культуральной жидкости, рН среды, температурный режим и скорость вращения качалки оставили без изменений, т.к. они являются самыми оптимальными для культивации дрожжей *S. guilliermondii* [1].

В следующей серии экспериментов изучалась субстратная индукция оксидазы D-аминокислот дрожжей *S. guilliermondii* при их выращивании на питательных средах, содержащих различные аминокислоты в качестве источника азота (кроме сульфата аммония) [3]. Поскольку для нормального роста микроорганизмов необходимым количеством аминокислот является 20 мг/л для D-форм и 40 мг/л для DL-рацематов, то для изучения индукции в состав жидкой среды добавлялось в 5 раз больше необходимого количества, т.е. 100 мг/л и 200 мг/л для D-форм и DL-рацематов соответственно. Полученные данные приведены в табл.2.

Как и следовало ожидать, существенных изменений в нарастании биомассы не наблюдалось, но было важно показать, что добавление 0,01% ZnSO_4 в состав питательной среды повышает активность D-аминокислотной оксидазы, а из аминокислот аналогичное влияние наблюдается при использовании D-пролина. Эти дан-

ные совпадают с данными некоторых исследователей [14] о том, что D-пролин является хорошим субстратом для D-аминокислотной оксидазы из некоторых объектов. Незначительное усиление активности наблюдается также при добавлении D-валина и DL-метионина. Но поскольку повышение активности фермента незначительное, то с биотехнологической точки зрения использование таких ценных материалов как D-аминокислоты, становится нецелесообразным.

Таблица 2. Влияние ZnSO₄ и некоторых аминокислот на рост микроорганизмов и активность фермента

№	Наименование	Биомасса, г/л	Активность (S=D-Pro), Ед/мг	Активность (S=D-Ala), Ед/мг
1	К	24	0,0041	0,0049
2	ZnSO ₄	23.16	0,0051	0,0055
3	DL-Ала	24.78	0,0039	0,0033
4	D-Вал	24.96	0,0046	0,0045
5	D-Про	26.42	0,005	0,0053
6	DL-Мет	25.62	0,0047	0,0057
7	DL-Тре	25.42	0,0035	0,0041
8	DL-фенил-β-Ала	25.51	0,0042	0,0045

Далее изучалось влияние степени аэрации на прорастание клеток и активность фермента. С этой целью в пяти колбах емкостью 500 мл были взяты разные количества жидкой питательной среды (от 10 до 100 мл).

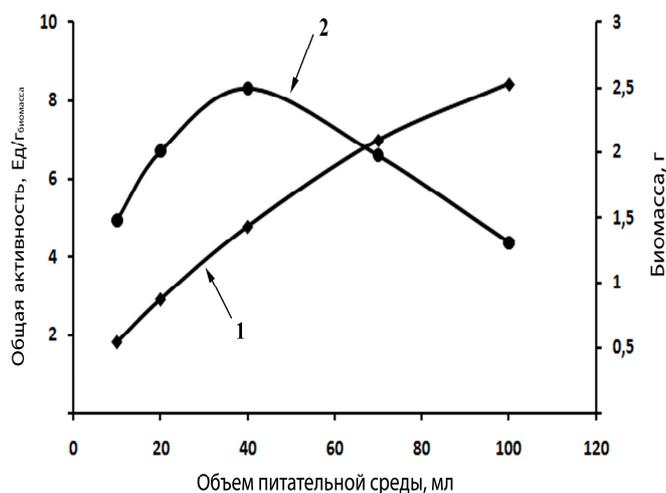


Рис. 2. Влияние аэрации на рост дрожжей и общую активность фермента. 1. Биомасса дрожжей, 2. Общая активность, Ед/г биомассы

Как видно из результатов, самым эффективным объемом для получения большей биомассы (в пересчете на 1 л КЖ) является 10 мл, но с количественной стороны целесообразно взять большие объемы питательной среды для культивации. Пик активности фермента наблюдается в области 40 мл питательной среды в 500 мл колбе.

следующей серии экспериментов изучалось оптимальное время культивации клеток *C. guilliermondii*. С этой целью проводилось два основных типа изучений. В первую очередь просто сравнивались образцы, взятые через каждые 2 ч в интервале от 14 до 26 ч. Но для получения более точных закономерностей было сделано следующее: в колбу емкостью 500 мл добавлялось 50 мл питательной среды, зараженной дрожжами *C. guilliermondii*, и было поставлено на качалку для ферментации в течение 12 час. После 12 ч роста бралось 10 мл среды (образец № 1), а на оставшиеся 40 мл добавлялось 360 мл свежей стерильной питательной среды (разбавление в 10 раз) и было поставлено на дальнейшую ферментацию в 8 колбах по 50 мл питательной среды в каждой. Скорость вращения качалки 200 об/мин, температура - 30°C. Следующие образцы (№ 2-9) были взяты с интервалом 1,5 ч. Результаты были такие (рис.3).

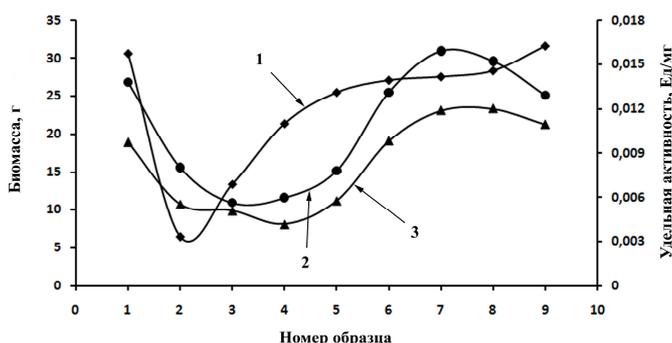


Рис. 3. Динамика накопления биомассы дрожжей *C. guilliermondii* и изменения активности D-аминокислотной оксидазы в процесс е культивации 1. Биомасса, г 2. Удельная активность (10 мин), Ед/мг, 3. Удельная активность (20 мин), Ед/мг

Как видно из диаграмм, экспоненциальная фаза роста этих дрожжей находится в диапазоне 4-6 ч после добавления свежей питательной среды. Однако в это время наблюдается понижение активности фермента. Активность D-аминокислотной оксидазы вновь нарастает в стационарном этапе роста (9-12 ч после добавления свежей питательной среды). Согласно полученным результатам, предлагаемые оптимальные условия для культивации клеток *C. guilliermondii* с высокой активностью D-аминокислотной оксидазы следующие: состав ферментационной среды (г/л): глюкоза -10; дрожжевой экстракт-10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -3,1; KH_2PO_4 - 0,23; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,125; NaCl -0,125; ZnSO_4 -0,1 (0,01%); биотин -0,00008; pH среды - 5,5). Косяки следует приготовить с 2 %-ным агарированием вышеупомянутой питательной среды; стерилизовать ферментационную среду при давлении 1 атм в течение 20 мин; стерильные препараты $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и биотина добавить после стерилизации КЖ. Ферментацию проводить в 500 мл колбах Эрленмейера с 40-50 мл КЖ и 0,5 мл посевного материала (приготовить 2 мл посевного материала из одного косяка). Продолжительность ферментации - 20 ч, температура - 30°C, скорость вращения качалки -200 об/мин. Центрифугировать (20 мин со скоростью 10000 g или 40 мин со скоростью 4000 g) и взвешивать мокрую биомассу. Приготовить суспензию клеток в 0,5 М Трис-НCl буфере (pH=8,3), обрабатывать ультразвуком в режиме 20 мин, после чего определить количество белка методом Гровса-Дейвиса,

а активность фермента - по выделившейся перекиси водорода, с D-пролином в качестве субстрата в составе инкубационной смеси. Активность фермента измерять в первые 10-20 мин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Давтян М.А., Багдасарян Е.Г.* Способ выращивания дрожжей. Авторское свидетельство СССР, N78053
2. *З. М., 1980. Оганисян С.П., Бабаян А.Г.* Образование D-аминокислотных оксидаз плесневыми грибами *Aspergillus niger* R-3. Биолог. журн. Армении, 43, 6, 5
3. *08-512, 1990. Багдасарян Е.Г.* Образование оксидазы D-аминокислот дрожжами рода *Candida*. Биолог. журн. Армении, 38, 7, 8
4. *75-879, 1985. Курочкина В.Б., Ныс П.С.* Антибиотики и химиотерапия, 47.
5. *с. 29, 2002. Beard T.M., Turner. N.J.* High-level expression of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. Chem. Commun. (Camb.) 3,
6. *p. 246, 2002. Conlon H.D., Bagal J., Baker K., Shen Y.Q., Wong B.L., Nolles R., Rausch C.W.* Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol. Bioeng.* 46,
7. *p. 510, 1995. Dominguez R., Serra B., Reviejo A.J., Pingarron J.M.* Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors, *Anal. Biochem.* 298,
8. *p. 275, 2001. Gabler M., Hensel M., Fischer L.* Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 6
9. *05-611, 2000. Gonzalez F.J., Monies J., Martín F., et al.* Molecular cloning of TvDAO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* yeast, 13, p
10. *. 1399, 1997. Horner R., Wagner F., Fischer L.* Induction of the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Applied and environmental microbiology*, June, 62, 6, 210
11. *6-2110, 1996. Ihaba Y., Mizukami K., Hamada-Sato N., Kobayashi T., Imada C., Watanabe E.* Development of a D-alanine sensor for the monitoring of a fermentation using the improved selectivity by the combination of D-amino acid oxidase and pyruvate oxidase. *Biosens. Bioelectron.* 19,
12. *p. 423, 2003. Nakajima N., Conrad D., Sumi H., Suzuki K., Esaki N., Wandrey C., Soda K.* Continuous conversion to optically pure l-methionine from d-enantiomer contaminated preparations by an immobilized enzyme membrane reactor. *J. Ferm. Bioeng.*, 70,
13. *p. 322, 1990. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S.* Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: a comparison between proteins from different sources. *Biotechnol. Prog.* 20,
14. *p. 467, 2004. Shrader T., Andreesen J.R.* Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. *Arch. Microbiol.*, 165,
15. *p. 41, 1996. Van Staden J.F., Stefan R.L., Aboul-Enein H.Y.* Amperometric biosensor based on D-aminoacid oxidase for the R-perindopril assay. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 367,
16. *p. 178. 2000. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N.* Characterization and high-level production of D-amino acid oxidase in *Candida boidinii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 3, 627-633, 2011.

Поступила 01.09.2011