

Биолог. журн. Армении, 1 (65), 2013

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ БИОСИНТЕЗА L-АЛАНИНА НОВЫМИ ШТАММАМИ-ПРОДУЦЕНТАМИ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

Л.О. МЕЛКОНЯН

Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА
lusine_melk@yahoo.com

Изучены основные параметры процесса биосинтеза L-аланина новыми штаммами-продуцентами *Brevibacterium flavum* GL1 и GL18, ауксотрофными по D-аланину, устойчивыми к D,L- α -аминоасляной кислоте и β -Cl-L-аланину.

Выявлено, что состав питательной среды способствует максимальному накоплению L-аланина. В разработанных условиях штаммы *Br. flavum* GL1 и GL18 продуцируют до 53,7 и 60,5 г/л L-аланина соответственно.

Brevibacterium flavum – штамм-продуцент – L-аланин – ферментация

Ուսումնասիրվել են L-ալանինի կենսասինթեզի հիմնական պարամետրերը՝ D-ալանինի նկատմամբ աուքսոտրոֆ, D,L- α -ամինակարագաթթվի ու β -Cl-L-ալանինի նկատմամբ կայուն *Brevibacterium flavum* GL1 և GL18 նոր շտամ-արտադրիչների միջոցով:

Պարզվել է, որ սննդային միջավայրի կազմը նպաստում է L-ալանինի առավելագույն կուտակմանը: Մշակված պայմաններում *Br. flavum* GL1 ու GL18 շտամներն արտադրում են մինչև 53,7 և 60,5 գ/լ L-ալանին համապատասխանաբար:

Brevibacterium flavum – շտամ-արտադրիչ – L-ալանին – ֆերմենտացիա

The basic process parameters of L-alanine biosynthesis by new strain-producers *Brevibacterium flavum* GL1 and GL18 were studied. They are auxotrophs for D-alanine, resistant to D,L- α -aminobutyric acid and β -chloro-L-alanine.

It was revealed that the composition of nutrient medium had contributed to the maximum accumulation of L-alanine. In the conditions selected, *Br. flavum* GL1 and GL18 produced up to 53.7 and 60.5 g/l of L-alanine, respectively.

Brevibacterium flavum – strain-producer – L-alanine – fermentation

L-аланин – заменимая аминокислота, входящая в состав белков мышечной и нервной тканей. Аланин является важным источником энергии для головного мозга и центральной нервной системы, укрепляет иммунную систему путем выработки антител, активно участвует в метаболизме сахаров и органических кислот.

L-аланин широко применяется в медицине в качестве одного из компонентов смеси для парентерального питания, в сельском хозяйстве и в пищевой промышленности.

Промышленное производство L-аланина было основано на способах энзиматического гидролиза, а в последующем микробиологической трансформации [2, 8, 11, 12].

Анализ источников патентной и другой научно-технической информации в области микробиологического способа получения L-аланина показал, что, несмотря на наличие штаммов-продуцентов L-аланина, полученных на основе микроорганизмов родов *Arthrobacter*, *Escherichia* и *Corynebacterium* [4, 9, 10, 13, 16,], отсутствует промышленное производство этой аминокислоты путем прямой ферментации из источника углерода [8, 17]. Известные штаммы микроорганизмов рода *Brevibacterium* в основном продуцируют рацемическую смесь – DL-аланин [4, 14, 15].

Штаммы-продуценты, способные к сверхсинтезу L-аланина у *Brevibacterium flavum*, впервые были получены в НИТИА (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА) на основе штамма дикого типа *Br. flavum* ATCC 14067. Наиболее активный штамм *Br. flavum* AA5 (ВКПМ В-3991), нуждающийся для роста в D-аланине (D-ala⁻) и устойчивый к D,L-α-аминоасляной кислоте (D,L-α-АМ К-г), в подобранных условиях культивирования продуцировал до 44,0 г/л L-аланина [3].

Нами на основе штамма *Br. flavum* AA5 методом химического мутагенеза были получены новые, устойчивые к β-Cl-L-аланину штаммы *Br. flavum* GL1 (ИНМИА 11841) и *Br. flavum* GL18 (ИНМИА 11842) с повышенным выходом L-аланина.

Целью настоящей работы было проведение оптимизации ферментационной питательной среды и подбор условий аэрации для выявления потенциальной аланинпродуцирующей способности этих штаммов.

Исследована динамика изменения основных физиологических характеристик процесса ферментации L-аланина у новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 с целью выявления параметров культивирования, при которых наблюдается максимальное накопление L-аланина.

Материал и методика. В работе использованы штаммы-продуценты L-аланина *Br. flavum* GL1 и GL18, ауксотрофные по D-аланину, устойчивые к D,L-α-аминоасляной кислоте и β-Cl-L-аланину (D-ala⁻; D,L-α-АМК-г; β-Cl-L-ala-г).

В качестве контроля был использован родительский штамм *Br. flavum* AA5.

Оптимизацию состава синтетической ферментационной среды осуществляли варьированием концентрации основных компонентов среды (источники углерода и азота, однозамещенный фосфорнокислый калий, мел, биотин, тиамин) в соответствии с результатами по определению количества аланина в культуральной жидкости (КЖ) в конце ферментации.

Ферментацию проводили на круговой качалке Innova 43 Shaker “New Brunswick Scientific” (США), при температуре 30°C. В колбы Эрленмейера емкостью 500 мл разливали по 15 мл ферментационной среды и 1 мл посевного материала. Посевным материалом служила культура, выращенная в питательной посевной среде следующего состава: сахароза – 3%, (NH₄)₂SO₄ – 3%, KH₂PO₄ – 0,1%, MgSO₄ – 0,1%, CaCO₃ – 3%, FeSO₄ · 7H₂O – 0,001%, MnSO₄ · 5H₂O – 0,001%, тиамина хлорид – 70 мкг/л, биотин – 500 мкг/л, D – аланин 100 мкг/мл. Выращивание посевного материала проводили в колбах емкостью 500 мл с объемом среды 50 мл на круговой качалке при 30°C в течение 16-18 ч.

Содержание L-аланина в КЖ после ферментации определяли методом бумажной хроматографии в системе Парtridge – бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:5), с последующим окрашиванием 0,5%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Количество аминокислоты определяли колориметрически при длине волны 490 нм после элюирования окрашенных пятен.

Количество остаточного сахара в культуральной жидкости определяли по методу Бертрана [6]. Оптическую плотность (ОП) бактериальной суспензии измеряли на фотоэлектроколориметре КФК-2 при длине волны 540 нм после предварительного растворения мела в среде добавлением 2N HCl.

Результаты и обсуждение. Для получения высокого выхода целевой аминокислоты при микробиологическом синтезе важную роль играют выбранный штамм, состав посевной и ферментационной среды, а также условия ферментации.

Общеизвестно, что в состав сред входят источники углерода, азота, а также минеральные элементы и ростовые факторы, количество и соотношение которых зависят от физиологических и биохимических потребностей конкретного штамма и определяют уровень выхода целевого продукта [5, 7].

Новые штаммы-продуценты *Br. flavum* GL1 и GL18, так же как родительский штамм *Br. flavum* AA5, являются ауксотрофами по D-аланину. В связи с этим, первоначально была изучена зависимость накопления L-аланина в КЖ от начальной концентрации D-аланина как основного ростового фактора, при 15%-ном содержании сахарозы в ферментационной среде. Усредненные данные 5-ти опытов представлены в табл. 1.

Табл. 1. Зависимость накопления L-аланина от концентрации D-аланина в ферментационной среде

D-аланин, мкг/мл	Штамм					
	GL1	GL18	GL1	GL18	GL1	GL18
	выход L-аланина, г/л	остаточный сахар, %	оптическая плотность			
50	28,3	34,6	8,0	6,5	40,0	48,7
100	44,5	52,5	0,78	0,5	52,2	55,5
150	44,0	51,1	0,8	0,54	52,1	55,3
200	42,3	49,4	0,85	0,6	53,8	56,2
250	40,2	47,7	0,78	0,62	54,4	56,6

Из данных, представленных в табл. 1, было сделано заключение, что оптимальная концентрация D-аланина находится в пределах 100-150 мкг/мл. В этом диапазоне наблюдается максимальное накопление L-аланина. При более высоких концентрациях D-аланина практически при одинаковом потреблении источника углерода наблюдается увеличение роста культуры без существенного повышения выхода конечного продукта.

Для выявления максимальной аланинпродуцирующей способности штаммов-продуцентов было исследовано также влияние различных источников углерода при одинаковой начальной концентрации (15% по сахару) на выход L-аланина (табл. 2).

Табл. 2. Влияние различных источников углерода на выход L-аланина

Источник углерода	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
Глюкоза	65	69
Сахароза	100	100
Меласса	45	55
Сахарный песок	77	83

Как видно из табл. 2, максимальный выход L-аланина наблюдается в том случае, когда в качестве источника углерода используется сахароза.

Нами исследована также динамика утилизации сахарозы в процессе ферментации. Было установлено, что наибольший выход целевого продукта и полное усвоение источника углерода наблюдается к 96-му часу ферментации при 15% начальной концентрации сахарозы (табл. 3).

Как показали дальнейшие исследования, на синтез аланина оказывает влияние не только концентрация сахарозы в ферментационной среде, но и содержание сульфата аммония как источника азота. Результаты представлены в табл. 4.

Табл. 3. Динамика накопления L-аланина штаммами-продуцентами GL1 и GL18 при 15% начальной концентрации сахарозы

Время ферментации, ч	Штамм					
	GL1	GL18	GL1	GL18	GL1	GL18
	выход L-аланина, %	оптическая плотность	остаточный сахар, %			
24	4,4	6,2	23	25	11,3	10,6
48	40,1	42,2	40	44	8,6	7,5
72	60,8	67,1	59	63	4,0	3,1
96	100	100	68	75	0,6	0,4

Табл. 4. Зависимость накопления L-аланина от концентрации сульфата аммония в ферментационной среде

(NH ₄) ₂ SO ₄ , %	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
3,0	48,8	58,8
4,0	82,1	72,9
5,0	79,5	84,1
5,5	100	100
6,0	76,1	84,1

Как видно из табл. 4, наибольший выход L-аланина достигается при содержании 5,5% сульфата аммония.

Таким образом, максимальная биосинтетическая активность новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 наблюдается в среде, содержащей 15% сахарозы и 5,5% сульфата аммония. Отклонения в сторону повышения или понижения концентраций сахарозы и сульфата аммония в ферментационной среде приводили к снижению уровня накопления аланина.

Поскольку немаловажную роль в процессе жизнедеятельности микроорганизмов играют такие макроэлементы, как фосфор и калий, нами были проведены эксперименты по определению их оптимальной концентрации в ферментационной среде (табл. 5).

Табл. 5. Зависимость накопления L-аланина от концентрации однозамещенного фосфорнокислого калия в ферментационной среде

KN ₂ PO ₄ , %	Выход L-аланина, %	
	штамм	
	GL1	GL18
0,1	100	100
0,3	87	92
0,5	63	72
0,7	55	67
1,0	33	42

На основе данных, представленных в табл. 5, можно заключить, что для наибольшего накопления L-аланина оптимальной концентрацией однозамещенного фосфорнокислого калия является 0,1% его содержания в среде. Повышение количества этой соли приводит к уменьшению выхода L-аланина у обоих продуцентов.

Значительную роль в процессе биосинтеза аминокислот продуцентами *Br. flavum* играют витамины. Эксперименты по влиянию различных концентраций

биотина и тиамин показали, что максимальный уровень накопления аланина в КЖ наблюдается при содержании в ферментационной среде 500 мкг/л биотина и 70 мкг/л тиамин.

Усредненные данные 7-и опытов представлены в табл. 6.

Табл. 6. Зависимость выхода L-аланина от концентрации тиамин и биотин в ферментационной среде

Биотин, мкг/мл	Штамм		Тиамин, мкг/мл	Штамм	
	GL1	GL18		GL1	GL18
	выход L-аланина, %			выход L-аланина, %	
100	69	75	50	45	51
200	79	84	60	49	55
300	80	89	70	100	100
400	87	93	80	90	96
500	100	100	90	77	89
600	100	100	100	65	71

Для поддержания в течение всего процесса ферментации оптимума pH (pH 7-8), необходимого для нормального роста культур и синтеза L-аланина, в ферментационную среду добавляли мел. Результаты представлены на рис. 1.

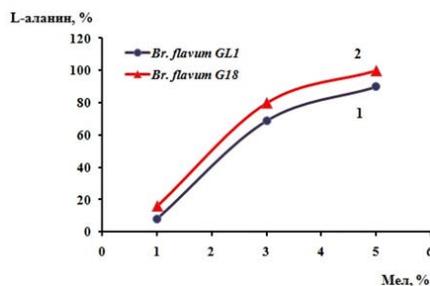


Рис. 1. Зависимость накопления L-аланина от концентрации мела в ферментационной среде

Эксперименты показали, что снижение концентрации мела в ферментационной среде ниже 5% приводит к снижению pH среды в процессе ферментации, что отрицательно влияет на накопление L-аланина.

Кислород является одним из тех факторов, который в процессе культивирования микроорганизмов существенно влияет на рост штаммов и на синтез аминокислот. В связи с этим изучалось влияние уровня аэрации на синтез аланина. Для этого была проведена серия экспериментов по ферментации на качалке с разным числом оборотов вращения в минуту – 150-300 об/мин.

Усредненные результаты экспериментов со штаммом GL18, изображенные графически (рис. 2), наглядно показывают, что наибольшее количество целевой аминокислоты накапливается при ферментации на качалке со скоростью вращения 200, 220 об/мин. Соответствующие эксперименты позволили выяснить, что при ферментации на качалке с большим или меньшим числом оборотов замедляется рост изучаемых продуцентов и контрольного штамма, вследствие чего не полностью утилизируется источник углерода среды и не синтезируется возможно максимальное количество L-аланина.

В серии экспериментов, когда в процессе ферментации меняли скорость вращения инкубационной качалки, выяснилось, что потребность культур в кислороде неодинакова на протяжении всего процесса. Сравнение кривых, представленных на рис. 2, показало, что по своим основным характеристикам проведение ферментации при поэтапном изменении скорости вращения качалки превосходит контрольные ферментации при постоянном уровне аэрации.

При ведении процесса при разных режимах аэрации 250 об/мин до 24 ч и 220 об/мин после 24 ч и до конца ферментации обеспечивается накопление в КЖ большего количества L-аланина.

На основании полученных данных наиболее рациональным оказалось ведение процесса биосинтеза L-аланина при скорости вращения качалки 250 об/мин до стационарной фазы роста культур и 220 об/мин до конца ферментации. При указанных параметрах ведения процесса наблюдается максимальный рост штаммов, наибольшая конверсия сахара и выхода L-аланина.

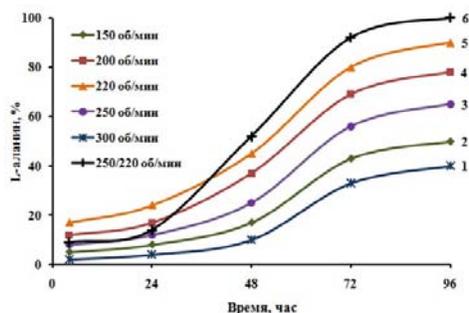


Рис. 2. Результаты ферментации штамма-продуцента *Br. flavum* GL18 в разных условиях аэрации, об/мин

1)300; 2) 150; 3)250; 4)200; 5)220; 6)250/220

Степень накопления аминокислоты, в том числе L-аланина в ферментационной среде во многом зависит от количества, качества и возраста используемого посевного материала. Следовательно, для получения активного инокулята необходимо сделать правильный подбор и определить оптимальные условия выращивания посевного материала.

Согласно результатам роста культуры, при оптимизации посевной среды по источникам углерода и азота, были выбраны следующие показатели: сахароза – 3%; сульфат аммония – 3%.

В опытах с целью определения оптимального возраста посевного материала использовалась культура, выращенная в течение 8, 12, 18, 20, 24 ч. Результаты по биосинтезу аланина в зависимости от возраста посевного материала (ВПМ) представлены в виде диаграммы на рис. 3.

Как видно из рис. 3, максимальное накопление L-аланина в КЖ наблюдается при засеве ферментационной питательной среды посевным материалом, выращенным в течение 18-20 ч, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста культур. Дальнейшее увеличение продолжительности выращивания посевного материала приводит к снижению выхода целевого продукта. Уменьшение синтеза аланина наблюдается также при использовании посевного материала, взятого в начале экспоненциальной фазы роста продуцентов.

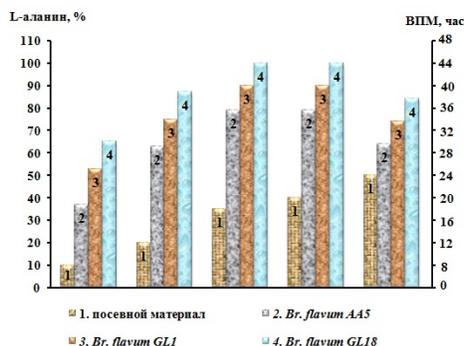


Рис. 3. Зависимость выхода L-аланина от возраста посевного материала

Таким образом, на основе результатов исследования физиологических особенностей новых штаммов-продуцентов *Br. flavum* GL1 и GL18 и оптимизации технологических параметров процесса ферментации установлено, что наибольшее накопление L-аланина (53,7 г/л и 60,5 г/л соответственно) достигается в среде следующего состава: сахара – 15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,5%, K_2HPO_4 – 0,1%, MgSO_4 – 0,1%, CaCO_3 – 5%, биотин – 500 мкг/л, тиамин – 70 мкг/л, D-аланин 100 мкг/мл, при скорости вращения кашалки 250 об/мин до стационарной фазы роста культур и далее 220 об/мин до конца ферментации (рис. 4).

Полученные новые штаммы *Br. flavum* GL1 и GL18 превосходят по выходу целевого продукта, коэффициенту конверсии сахара и производительности процесса родительский штамм *Br. flavum* AA5.

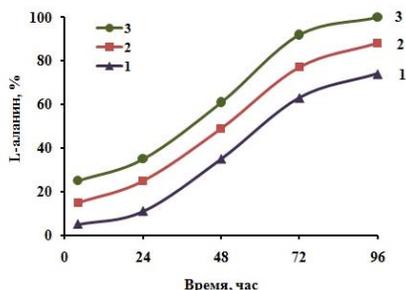


Рис. 4. Сравнительный выход L-аланина у штаммов-продуцентов *Br. flavum*:
1. *Br. flavum* AA5; 2. *Br. flavum* GL1; 3. *Br. flavum* GL18

Предлагаемый нами способ получения L-аланина штаммами-продуцентами *Br. flavum* GL1 и GL18 запатентован в Республике Армения [1].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аветисова Г. Е., Мелконян Л. О., Чахалян А. Х., Сагиян А. С. Способ получения L-аланина. Патент РА, № 2691 А, 2012.
2. Дюкова К.Г., Агаджанян А.Е., Амбарцумян А.А., Алебян Г.П. Усовершенствованная технология получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина путем биотрансформации DL-аспарагиновой кислоты. Биотехнология, № 4, 69-77, 2009.

3. Патент США. 1992. № 5124257.
4. Патент США. 1996. № 5559016.
5. Тимощенко Л.В., Чубик М.В., Пестряков А.Н. Основы микробиологии и биотехнологии. 2012.
6. Филипович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. М., 1982.
7. Goyal D. General Microbiology. 2007.
8. Dworkin M., The Prokaryotes: Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology. 3rd ed. /Kumagai H., Springer, 1, Chapter 3.2. p. 756–765, 2006.
9. Hashimoto S., Katsumata R. L-Alanine fermentation by an alanine racemase-deficient mutant of the dl-alanine hyperproducing bacterium *Arthrobacter oxydans* HAP-1. *J. Ferm. Bioeng.*, 86, 4, p. 385–390, 1998.
10. Hashimoto S., Katsumata R. Overproduction of alanine by *Arthrobacter* strains with glucose-nonrepressible L-alanine dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.*, 15, 11, pp. 1117–1122, 1993.
11. Hols P., Kleerebezem M., Schanck A., Ferain T., Hugenholtz J., Delcour J., De Vos W. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering, *Nat. Biotechnol.*, 17, pp. 588–592, 1999.
12. Ikeda M. Amino Acid Production Processes. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, 79, pp. 1–35, 2003.
13. Lee M., Smith G.M., Eiteman M.A., Altman E. Aerobic production of alanine by *Escherichia coli* aceF ldhA mutants expressing the *Bacillus sphaericus* alaD gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 1, p. 56–60, 2004.
14. Nagwa M. A., Zaki D.A., Abd-El-Aziz F. Activation of Alanine Biosynthesis by *Brevibacterium flavum* Through Optimization of Culture Conditions, UV Irradiation and EMS Using Low Quality Dates, *J. Appl. Sci. Res.*, 3, 12, pp. 1950–1959, 2007.
15. Shen Q., Shao G., Zhao M., Chen T. DL-alanine fermentation by a mutant of *Brevibacterium flavum* ATCC 21269. *Weishengwuxue Zazhi*, 10, 4, pp. 1–5, 1990.
16. Smith G.M., Lee S.A., Reilly K.C., Eiteman M.A., Altman E. Fed-batch two-phase production of alanine by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 28, 20, pp. 1695–1700, 2006.
17. Wada M., Narita K., Yokota A. Alanine production in an H⁺-ATPase- and lactate dehydrogenase-defective mutant of *Escherichia coli* expressing alanine dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 4, pp. 819–825, 2007.

Поступила 06.08.2012