

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТХОДОВ БРОДИЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В БИОСИНТЕЗЕ ВИТАМИНА В₁₂

А.М. БАЛЯНИ, А.Г. МЕЛКУМЯН, Э.К. АФРИКЯН

Республиканский центр депонирования микробов НАН и Министерства
образования и науки РА, 378510, г.Абовян

Изучали биосинтез витамина В₁₂ пропионовыми бактериями. Установлено, что производственную среду для получения витамина В₁₂ можно модифицировать использованием отходов дрожжевой промышленности практически без ущерба для выхода биомассы и витамина. Показана возможность использования углекислого газа для перемешивания культуральной жидкости при ее нейтрализации в процессе роста пропионовых бактерий.

Ըստոճնախիբել է պրոպիոնաբբվային բակտերիաների կողմից վիտամին В₁₂-ի սինթեզը Ֆաստատված է, որ վիտամին В₁₂-ի ստացման արտադրական միջավայրը կարելի է ձևափոխել, օգտագործելով շաքարասնկային արտադրության բաժինները, որը չի բերում կենսազանգվածի և վիտամինի ելքի նվազման Ցույց է տրված ածխածնի երկօքսիդի օգտագործման հնարավորությունը բակտերիաների աճման ընթացքում կուլտուրայի հեղուկի քափահարման և նրա չեզոքացման համար:

The data on biosynthesis of vitamin В₁₂ by strains of *Propionibacterium* have been presented. The industrial medium for production of vitamin В₁₂ could be modified by using the wastes of yeast industry without decrease of biomass and vitamin yield. During the growth of *Propionibacterium* the possibility of carbon dioxide use was shown.

Цианокобаламин - пропионовые бактерии - 5,6-диметилбензимидазол

Витамин В₁₂, или цианокобаламин, входит в состав ферментов, участвующих в важнейших метаболических процессах, в частности в восстановлении рибонуклеотидов в дезоксирибонуклеотиды, в реакциях трансметилирования, в образовании метионина из гомоцистеина и изомеризации метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА.

Существующие промышленные способы получения витамина В₁₂ основаны на его микробиологическом синтезе с использованием высокоактивных штаммов бактерий, продуцирующих корриноиды (*Pseudomonas denitrificans*, *Propionibacterium shermanii*, метанобразующие бактерии) [1,2,3].

В настоящей работе представлены результаты изучения возможностей удешевления процесса биосинтеза витамина В₁₂ и использования отходов микробиологической промышленности для его получения.

Обобщены результаты исследования по биосинтезу витамина В₁₂ с использованием штаммов пропионовых бактерий (ПКБ).

Материал и методика. В работе были использованы культуры *Propionibacterium shermanii* ИНИИА 10846 и 10847.

Посевной материал выращивали в анаэробных условиях при температуре 28-30° в течение 72ч на среде следующего состава (%): глюкозы - 2,0; кукурузный экстракт - 3,0; аммоний серноокислый - 0,2; кобальт хлористый - 0,0005; рН 6,8-7,0.

Основную ферментацию проводили при тех же условиях на производственной среде СП-4, содержащей (%): глюкозу - 4; кукурузный экстракт - 6; аммоний серноокислый - 0,3;

кобальт хлористый — 0,01. Весь процесс протекает 120ч (72ч роста и 48ч — после добавления нуклеотидного основания — 2,6-диметилбензимидазола (2,6-ДМБ). 2,6-ДМБ добавляли по расчету 15мг/л. Начиная с 18ч от начала роста проводили периодическую нейтрализацию среды 40%-ным NaOH, перемеривание осуществляли продувкой углекислым газом или механически.

В течение ферментации определяли количество редуцирующих веществ методом Сомеджи-Нельсона [4,6]. Количество витамина В₁₂ определяли фенат-зидроформинным методом [5]. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре СФ-46. Использовали 2,6-ДМБ фирмы "Sigma" и реактивы отечественного производства. Ферментации проводили как в колбах Эрленмейера, так и в 20-литровых ферментерах.

Испытывали следующие отходы: дрожжевое молоко (квасные дрожжи), автолизат пивных дрожжей и спиртовую барду.

Результаты и обсуждение. Указанные отходы вносили в питательную среду в различных концентрациях, одновременно уменьшая количество кукурузного экстракта до 3%. Остальные компоненты среды СП-4 и их концентрации не изменяли.

Опыты показали, что частичная замена кукурузного экстракта дрожжевыми отходами в различных концентрациях дает благоприятный эффект, за исключением отходов спиртовых производств (спиртовая барда). Из табл. 1 видно, что для шт. 10846 автолизат пивных дрожжей в количестве до 25% может использоваться без ущерба для выхода биомассы и витамина В₁₂, а дрожжевое молоко и спиртовая барда — неприемлемы. Для шт. 10847 возможны все исследованные варианты, кроме спиртовой

Таблица 1. Влияние состава питательной среды на накопление биомассы и выход витамина В₁₂ у штаммов *P. shermanii* ИИМИА 10846 и 10847

Состав среды,		Выход сухой биомассы, г/л		Выход витамина В ₁₂ , % по сухому весу	
		шт.10846	шт.10847	шт.10846	шт.10847
Контроль, среда СП-4		62,5	75,5	0,25	0,06
СП-4 с 3% кукурузного экстракта + дрожжевое молоко (об/об)	10%	50,0	56,5	0,07	0,08
	25%	57,5	69,0	0,04	0,045
СП-4 с 3% кукурузного экстракта + автолизат пивных дрожжей (об/об)	10%	90,0	93,5	0,23	0,07
	25%	90,0	90,5	0,235	0,05
	100%	100,0	88,0	0,085	0,08
СП-4 с 3% кукурузного экстракта + автолизат пивных дрожжей (об/об)	10%	20,1	27,5	-	-
	20%	15,0	20,0	-	-
	30%	10,5	16,5	-	-

барды.

Как известно, в процессе интенсивного роста культуры ПКБ продуцируют пропионовую и уксусную кислоты [3], которые снижают pH среды, что приводит к вымыванию витамина из клеток и снижению скорости накопления биомассы. Поэтому начиная с 16-18 ч роста ПКБ проводились периодические корректировки pH среды щелочью (обычно стерильным 40%-ным раствором NaOH или 15%-ным Na₂CO₃). Использование NaOH оправдано тем, что снимается необходимость стерилизации. Как видно из табл. 2, культуры бактерий реагируют на

указанные основания одинаково, при этом выход витамина B_{12} остается в пределах 0,2-0,3% на сухой вес биомассы. После добавления предшественника (5,6 ДМБ) в течение 48 ч непрерывно подавали стерильный воздух. Из табл. 2 видно также, что после внесения 5,6-ДМБ на 72 ч роста ПКБ в процессе перехода фактора В в полные коррионды аэрации культуральной жидкости (КЖ) дает положительный эффект.

Таблица 2. Влияние аэрации и способа корректировки pH на накопление биомассы и выход витамина B_{12} у пропионовокислых бактерий

Вариант корректировки pH	Штаммы	Аэрация	Выход сырой биомассы, г/л	Выход витамина B_{12} , % по СВ биомассы
NaOH	10846	без аэрации ++	31,0 33,0	0,36 0,32
	10847	без аэрации +	25,0 40,0	0,21 0,26
NH ₄ OH	10846	без аэрации +	30,4 32,2	0,28 0,3
	10847	без аэрации +	32,0 31,5	0,23 0,3

Учитывая значительные энергетические затраты при перемешивании КЖ в процессе ее нейтрализации, изучали возможность использования продувки углекислым газом.

Таблица 3. Влияние способа перемешивания КЖ на накопление биомассы и биосинтез витамина B_{12}

Способ перемешивания	Штамм	Выход сырой биомассы, г/л	Выход витамина B_{12} , % по СВ биомассы
Механический	10846	30,2	0,33
	10847	35,0	0,18
Продувка углекислым газом	10846	27,1	0,35
	10847	31,0	0,19

Результаты выполненных работ показали (табл. 3), что продувка КЖ углекислым газом не влияет на выход биомассы и витамина B_{12} , который остается на уровне контроля. При этом уменьшается возможность заражения КЖ посторонней микрофлорой и улучшаются анаэробные условия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быховский В.Я. Микробиологический синтез витамина B_{12} . М., 1984.
2. Быховский В.Я., Зайцева Н.И. Итоги науки и техники, 32, 1989.
3. Воробьев Л.И. Пропионовокислые бактерии. Изд-во Московского университета, М., 1995.
4. Nelson N.J. J. Biol. Chem., 153, 375-381, 1944.
5. Ono H., Fukuoka K. J. Ferm. Assoc., 16, 111, 1958.
6. Somogyi M J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.

Поступила 28.IV.1997