

УДК: 579.66 (06)

Н. А. Кустова, Н. Ю. Чунахина

**БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ГЛИЦЕРИНА
НЕРАЗМНОЖАЮЩИМИСЯ КЛЕТКАМИ
GLUCONOBACTER OXYDANS**

*Исследована возможность получения диоксиацетона (ДОА) – высокореактивной кетотриозы, широко применяемой в различных областях промышленности, путем биотрансформации глицерина неразмножающимися клетками ацетобактерии *Gluconobacter oxydans*. Подобраны оптимальные условия культивирования *G. oxydans*, показана возможность организации непрерывного процесса получения ДОА свободными неразмножающимися клетками с применением микрофльтрации.*

*The article examines the possibility of the biosynthesis of dihydroxyacetone (DHA) – a highly reactive ketotriose used in different industry branches via glycerol biotransformation by nonproliferating *Gluconobacter oxydans* cells. The authors define the optimal conditions for *Gluconobacter oxydans* cultivation and show the possibility of the continuous process of DHA synthesis by free nonproliferating cells accompanied by micro filtration.*

Ключевые слова: глицерин, биотрансформация, диоксиацетон, неразмножающиеся клетки, *Gluconobacter oxydans*.

Keywords: Glycerol, biotransformation, dihydroxyacetone, nonproliferating cells, *Gluconobacter oxydans*.

Gluconobacter oxydans subsp. *suboxydans* (Kluyver and de Leeuw, 1924; de Ley and Frateur, 1974; Approved Lists, 1980) – грамотрицательные бактерии, принадлежащие к роду *Acetobacter*. Форма клеток эллипсоидальная с размером 0,5–0,8×0,9–4,2 мкм. Клетки расположены по одной или парами, редко собраны в цепочки. *G. oxydans* – облигатные аэробы со строго окислительным типом метаболизма и кислородом в качестве конечного акцептора электронов.

Ферменты *G. oxydans* делятся на две группы, с учетом их локализации и функционирования. Одна из групп связана с бактериальной мембраной и сопряжена с цитохромной системой. Ферменты второй группы катализируют внутриклеточный метаболизм и, соответственно, сосредоточены во внутриклеточном пространстве.

Известно, что окисление глицерина осуществляется дегидрогеназами двух типов: мембранно-связанная действует в кислой среде и не требует для своей активности пиридиннуклеотидов, а растворимая – в щелочной и зависит от НАД (никотинамиддинуклеотид).

Gluconobacter – важная промышленная культура, используемая для получения L-сорбозы из D-сорбитола, D-глюконовой кислоты, 5-кето- и 2-кетоглюконовой кислот из D-глюкозы и диоксиацетона из глицерина [1].



Диоксиацетон (ДОА) используется в ряде отраслей промышленности в качестве:

- инициатора реакций получения искусственных смол и полимеров, а также компонента искусственных красителей;
- консерванта крови; лекарственного средства против ряда заболеваний;
- красителя натуральных тканей и мехов, а также средством против сминаемости и усадки тканей.

Наиболее известно применение ДОА в косметической промышленности в качестве добавки в кремы типа «автобронзат» для придания коже устойчивого коричневого оттенка, сходного с эффектом загара.

Диоксиацетон представляет собой окисленный продукт глицерина.

Схема ферментативной реакции окисления глицерина представлена ниже:

Глицеролдегидрогеназа + кислород

Глицерин → Диоксиацетон

В промышленности применяют штамм *G. oxydans* ATCC 621 [1].

Известные микробиологические способы получения ДОА используют глицеролдегидрогеназную активность культуры *G. oxydans*, развивающейся в полноценной питательной среде. При этом основной углеродный субстрат среды расходуется, в основном, на прирост биомассы клеток микроорганизмов, а не на использование их ферментативной активности на процесс биотрансформации глицерина в ацетон [2].

В рассматриваемой нами новой технологии, разработанной на кафедре биотехники Московского государственного университета инженерной экологии, процесс складывается из двух основных стадий. Сначала используется традиционный процесс ферментации для наращивания биомассы клеток микроорганизмов. Затем происходит разделение микроорганизмов и среды с остатками ростовых факторов. Сгущенные микроорганизмы помещают в специальную облегченную среду, не содержащую ростовых факторов, в которой и осуществляется процесс биотрансформации глицерина в диоксиацетон. Скорость трансформации глицерина неразмножающейся культурой в среде, не содержащей источников азота и витаминов, сравнима или даже превосходит скорость трансформации, осуществляемой растущими бактериями [2].

Преимущество процессов с использованием неразмножающихся клеток заключается в:

- применении более простой по составу среды;
- снижении себестоимости продукта;
- уменьшении количества отходов;
- упрощении выделения конечного продукта [2].

Целью исследования послужило изучение условий трансформации глицерина в ДОА свободными неразмножающимися клетками *G. oxy-*



oxydans, обеспечивающих максимальную продуктивность процесса и операционную стабильность клеток бактерий.

Материал и методы

Объектом исследования являлся штамм уксуснокислых бактерий *G. oxydans* 621 (коллекция СПбГУ). Бактериальная культура поддерживалась на агаризованной среде постоянного состава, содержащей 6 % глицерина, 0,2 % KH_2PO_4 и 0,3 % (по сухим веществам) дрожжевой воды. При выращивании бактерий в питательную среду вносили глицерин и субстрат конструктивного обмена (СКО), в состав которого входили азотсодержащие вещества, витамины и стимуляторы роста. В качестве СКО использовали дрожжевую воду. Концентрация глицерина в этой среде в разных экспериментах варьировала от 8 до 15 %. Культуру выращивали в колбах на качалках, бактерии отделяли центрифугированием, промывали водой и средой для трансформации. Эксперимент выполнялся в биореакторах объемом 1 и 250 л. Уровень аэрации варьировали путем изменения числа оборотов мешалки и добавлением чистого кислорода к аэрирующему воздуху. Интенсивность аэрации выражали величиной сульфитного числа. Количество растворенного кислорода определяли с помощью мембранного датчика гальванического типа. Значение pH в ферментере контролировали с помощью pH-метра.

Посевным материалом для биотрансформации служили клетки, находящиеся в фазе замедления роста. Объем посевного материала составлял 4–5 % рабочего объема.

Каждый этап эксперимента воспроизводили в трех повторностях, полученные данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Влияние дрожжевой воды. Результаты исследования влияния дрожжевой воды (субстрата конструктивного обмена – СКО) на удельную скорость роста биомассы *G. oxydans* и удельную скорость образования ДОА (рис. 1) позволяют говорить о том, что рост биомассы стимулируется с повышением концентрации СКО, а биотрансформация ДОА – ингибируется.

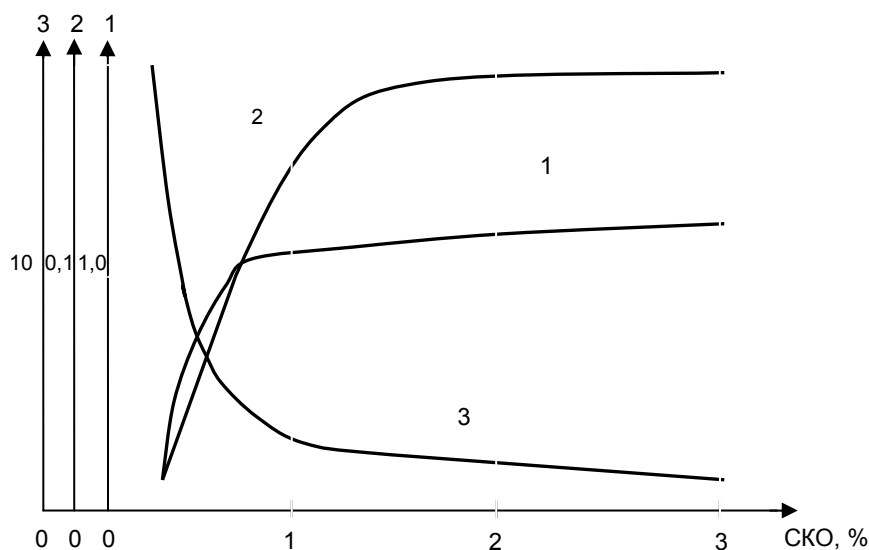


Рис. 1. Влияние концентрации дрожжевой воды на накопление биомассы *G. oxydans*, г/л:

1 – удельная скорость роста, гДОА/г · л⁻¹ · ч⁻¹;

2 – удельная скорость образования ДОА, гДОА/гСБ · ч [3]

Рост клеток при предварительном наращивании биомассы бактерий показал, что концентрация биомассы значительно возросла при увеличении количества дрожжевой воды от 0,15 до 1,5 % по сухим веществам, при этом урожай клеток составил 1,9–2,2 г/л. Такая зависимость характерна для дискордантных факторов по классификации В.В. Бирюкова [3] и свидетельствует о том, что процесс биотрансформации следует проводить при более низкой концентрации СКО, а концентрацию субстрата конструктивного обмена в ходе процесса ферментации следует снижать по определенной программе.

Влияние ингибитора белкового синтеза. Проведены эксперименты по изучению влияния ингибитора белкового синтеза – левомицетина – на биотрансформацию глицерина. Показано, что левомицетин в концентрации 25 мг/л увеличивал удельную скорость образования ДОА в 1,5 раза, а в концентрации 50 мг/л – в 2,5 раза при замедлении роста бактерий. Действие ингибитора окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола в концентрации 30, 50 и 100 мкг/л снижало урожай бактерий в 1,5; 2,0 и 3,5 раза соответственно, но увеличивало удельную скорость образования ДОА от 3,3 до 14 г ДОА/г СБ · ч.

Влияние величины рН. Для определения оптимальной величины рН при трансформации глицерина в ДОА неразмножающимися клетками в зависимости от количества реакционных циклов были поставлены опыты в ферментере объемом 250 л.

Общая картина зависимости удельной скорости образования ДОА от величины рН при многократном использовании биомассы подтверждала наличие двух глицеролдегидрогеназ. При центрифугировании



и промывании биомассы растворимая фракция глицеролдегидрогеназы вымывалась и быстро теряла свою активность в рабочем растворе, основное влияние на удельную скорость образования ДОА начинала оказывать «кислая» дегидрогеназа. В связи с чем уже с третьего цикла окисления оптимум рН сдвигался в кислую зону (рис. 2). При этом оптимальное значение рН снизилось с 7,5 до 6,0.

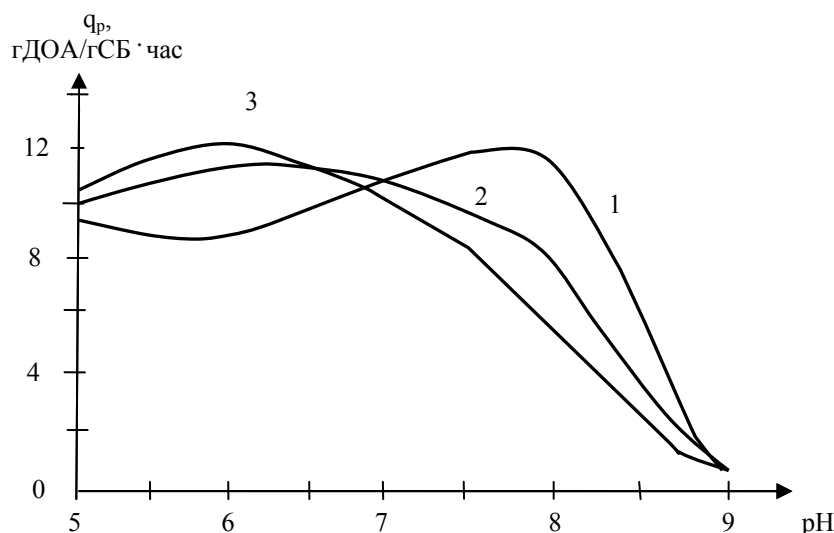


Рис. 2. Влияние pH на удельную скорость образования ДОА (q_p) при трансформации глицерина неразмножающимися клетками в последовательных циклах окисления (1, 2, 3)

Влияние концентрации глицерина. Для определения зависимости скорости образования ДОА от концентрации глицерина была проведена серия опытов в лабораторном ферментере объемом 1 л при концентрации глицерина от 5,0 до 150 г/л. Было показано, что зависимость удельной скорости образования ДОА от начальной концентрации глицерина в среде представляла собой гиперболу. Следовательно, можно предположить, что процесс трансформации глицерина в ДОА подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен. Результаты экспериментов подтвердили это предположение и позволили определить кинетическую константу K_s по глицерину, которая равнялась 28,6 г/л.

Результаты опытов по добавлению ДОА в количестве от 5,0 до 50,0 г/л в обычную среду для трансформации обнаруживали ингибирование скорости трансформации конечным продуктом.

Изменение концентрации глицерина от 6 до 20 % не влияло на рост биомассы при содержании в среде дрожжевой воды уже начиная с 0,15 %. При содержании в среде дрожжевой воды в количестве 0,5 % увеличение концентрации глицерина с 2 до 10 % повышало конечный урожай бактерий с 1,0 до 1,5 г/л.



Организация непрерывного биосинтеза ДОА неразмножающимися клетками. Исследовалась возможность осуществления непрерывного процесса биосинтеза ДОА неразмножающимися клетками. Полунепрерывный процесс осуществлялся таким образом, что при окислении 50–80 % заданного количества субстрата часть суспензии отбирали, а бактерии отделяли от раствора и возвращали в биореактор с новой порцией среды для окисления. При концентрации глицерина в среде 60 г/л было проведено 17 циклов с возвратом биомассы. При этом условии коэффициент разбавления составил 0,44 ч⁻¹, удельная скорость образования ДОА – 6,8 г ДОА/г СБ · ч, а продуктивность – 16,2 г ДОА/л · ч. При концентрации глицерина 80 г/л коэффициент разбавления составил 0,29 ч⁻¹, удельная скорость образования ДОА – 13,6 г ДОА/г СБ · ч, а продуктивность – 18,4 г ДОА/л · ч. Для изучения непрерывного процесса синтеза ДОА с удержанием биомассы в биореакторе опыты проводились в системе с микрофилтративной ячейкой, содержащей полупроницаемую ядерную мембрану из лавсанового волокна с диаметром пор 0,5±0,03 мкм. Основные технологические показатели непрерывного синтеза ДОА неразмножающимися клетками (таблица) позволяют сделать вывод о возможности осуществления непрерывного способа получения ДОА.

Таблица

Основные технологические показатели непрерывного процесса получения ДОА с применением микрофилтративной ячейки для удержания клеток биомассы в ферментере

Начальная концентрация глицерина в среде, г/л	40	60	80	100	120	200
Средняя продуктивность, г ДОА/л · ч	8,3	14,2	17,5	19,6	10,3	7,5
Выход ДОА, %	89,8	78,5	81,0	65,9	61,0	70,0

При этом в периодическом процессе ферментации с параллельной биотрансформацией глицерина в ДОА продуктивность процесса была ниже на 20–30 %, а выход глицерина – на 30–40 %.

Выводы

1. Подобраны условия культивирования *G. oxydans*, обеспечивающие максимальный урожай клеток и скорость роста.
2. Определены кинетическая константа K_s для кислорода, равная 0,898 мг/л, и коэффициент поддержания жизнедеятельности по кислороду, равный 0,84±0,17 г O₂/г СБ · ч.
3. Показано, что кинетика процесса трансформации глицерина неразмножающимися клетками подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен. Определена константа K_s , равная 28,6 г/л.
4. Показана возможность организации непрерывного процесса получения ДОА свободными неразмножающимися клетками с применением микрофилтративной ячейки.



Список литературы

1. Arun Gurra, Vinay K. Singh, G.N. Qazi, Anil Kumar. *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications // Mol. Microbiol. Biotechnol. 2001.Vol. 3. P. 445–456.
2. Кустова Н.А. Трансформация глицерина в диоксиацетон неразмножающимися клетками *Gluconobacter oxydans*: автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1994.
3. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М., 2004.

Об авторах

Н.А. Кустова — канд. биол. наук., доц., Московский государственный университет инженерной экологии, mguie@rambler.ru

Н.Ю. Чупахина — канд. биол. наук., доц., КГТУ, natalie-tch@yandex.ru

Authors

Dr. N. A. Kustova — Associate Professor, Moscow State University of Environmental Engineering, mguie@rambler.ru

Dr. N.Yu. Choupakhina — Associate Professor, Kaliningrad State Technical University, natalie-tch@yandex.ru