

УДК 577.150.6:575.24

Н.Н. ЯКИМОВИЧ, А.А. БИЛЬДЮКЕВИЧ, И.В. ЯКИМОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ НА РОСТ БИОМАССЫ
И БИОСИНТЕЗ ТРЕОНИНА ГЕННОИНЖЕНЕРНЫМ ШТАММОМ
ESCHERICHIA COLI XT-99***

The influence of nature and concentration of various growth factors on a biomass gain and biosynthesis of L-threonine by producer strain *Escherichia coli* XT-99 is investigated.

В ряде стран Восточной и Западной Европы, Латинской Америки и других регионах треонин является первой лимитирующей аминокислотой в пище человека [1]. Многочисленные исследования показали эффективность добавления треонина в рационы сельскохозяйственных животных и домашней птицы [2, 3]. В медицине треонин находит применение в сложной смеси аминокислот для парентерального питания [4].

Высокоэффективным технологическим процессом производства треонина является микробиологический синтез с последующей очисткой от высокомолекулярных соединений и выделением аминокислоты из культуральной жидкости. Биосинтез треонина проводят на жидких питательных средах, содержащих источники углеродного, азотного питания, макро- и микроэлементы. В качестве продуцентов используются высокопродуктивные бактериальные штаммы, полученные генноинженерным и методами.

Анализ данных литературы, а также результаты собственных исследований свидетельствуют о том, что состав питательных сред играет важную роль в интенсификации процессов биосинтеза ряда аминокислот, в частно

* Авторы статьи - сотрудники Института физико-органической химии НАН Беларуси.

сти L-треонина [5]. Среди компонентов питательных сред особое значение имеют ростовые факторы - вещества, определяющие скорость роста продуцента, максимальный уровень накопления биомассы и целевой аминокислоты.

Цель настоящей работы - изучение влияния природы и концентрации различных источников ростовых факторов (ИРФ) на выращивание биомассы и биосинтез треонина генноинженерным продуцентом *Escherichia coli* XT-99.

Материал и методика

В качестве продуцента L-треонина использовали генноинженерный штамм *Escherichia coli*, содержащий многокопийную плазмиду pYN 7 (молекулярная масса 5,8 МДа), которая обеспечивает устойчивость к пенициллину и несет гены треонинового оперона.

Культуру выращивали в течение 18-22 ч при температуре $37 \pm 0,5$ °C в пробирках на скошенном мясопептонном агаре с добавлением 2 % сахара и 100 мкг/мл пенициллина. Смыв культуры с косяков осуществляли физиологическим раствором. Полученную суспензию использовали при за-севе питательных сред, предназначенных для получения посевного материала в качалочных колбах.

Выращивание посевного материала проводили в 8 качалочных колбах вместимостью 750 см³, содержащих по 50 см³ питательной среды. Колбы устанавливали на термостатируемую (37 ± 1 °C) лабораторную качалку с частотой вращения 240 об/мин.

Биосинтез L-треонина осуществляли на лабораторной ферментационной установке в ферментаторе вместимостью 7,0 дм³, обеспеченном системами термо- и pH-статирования, датчиком измерения содержания растворенного кислорода воздуха, подаваемого для аэрации ферментационной среды, датчиком измерения оборотов мешалки, а также соответствующими регистрирующими приборами.

Посевной материал вносили в ферментатор в количестве 10 % от начального количества питательной среды. В качестве пеногасителя применяли лапрол ПД-1. Подпиточную питательную среду подавали с ферментатора с помощью перистальтических насосов.

Для изучения динамики роста культуры при получении посевного материала и биосинтезе L-треонина из качалочных колб и ферментатора отбирали стерильные пробы. Концентрацию биомассы продуцента в отобранных пробах определяли как величину оптической плотности (ОП) культуральной жидкости, разбавленной в 100 раз. Измерения проводили на фотоэлектроколориметре УХЛ-4.2 при длине волны 440 нм с использованием кюветы толщиной 0.5 см.

Концентрацию треонина в культуральной жидкости устанавливали методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей ацетон – изопропанол - аммиак. Количественное определение спектра аминокислот в ростовых факторах и в культуральной жидкости проводили методом газожидкостной хроматографии [6].

Содержание сахара находили по Бертрану в модификации Шорля [7].

В качестве источников ростовых факторов в составе питательных сред использовали кукурузный экстракт, L-изолейцин, кислотные гидролизаты паприны, хлебопекарных дрожжей, кормовых дрожжей (на гидролизатах древесины) и кислотный гидролизат «Провит». Источником углеродного питания являлся сахар-песок. Концентрации компонентов питательных сред варьировали в зависимости от задач эксперимента. Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены усредненные по трем повторным экспериментам данные по выращиванию посевного материала плазмидного продуцента *E. coli* XT-99 при использовании в составе питательных сред различных источников ростовых факторов.

Таблица 1

**Накопление биомассы продуцента L-трвонина *E. coli* XT 99 (ед. ОП)
в зависимости от концентрации ИРФ в питательной среде**

Наименование источника ростовых факторов	Содержание источника ростовых факторов в среде, г/л	Максимальное накопление биомассы, ед. ОП
Кукурузный экстракт	0,1	0,1
	0,3	0,15
	0,6	0,22
	0,9	0,15
	1,2	-
Гидролизат «Провита»	0,1	0,15
	0,3	0,20
	0,6	0,23
	0,9	0,25
	1,2	0,23
Гидролизат кормовых дрожжей	0,1	0,15
	0,3	0,21
	0,6	0,29
	0,9	0,30
	1,2	0,30
Гидролизат паприна	0,1	0,10
	0,3	0,17
	0,6	0,28
	0,9	0,27
	1,2	0,20
Гидролизат пекарских дрожжей	0,1	0,24
	0,3	0,29
	0,6	0,28
	0,9	0,30
	1,2	0,30
L-Изолейцин	0,1	0,14
	0,3	0,23
	0,6	0,25
	0,9	0,21
	1,2	-

Как видно из полученных данных, при использовании в составе питательных сред любого из исследуемых источников ростовых факторов возможно получить биомассу продуцента *E. coli* на уровне не менее 0,22 ед. ОП, для чего необходимо внести в питательную среду определенное количество ростовых факторов. Согласно данным табл. 1, при внесении в питательную среду около 0,3 мг/мл L-изолейцина оптическая плотность культуральной жидкости достигает 0,23 ед., что количественно соизмеримо с использованием сложных по составу гидролизатов белоксодержащего сырья.

В табл. 2 приведен аминокислотный состав ростовых факторов, которые были взяты в наших исследованиях для получения посевного материала продуцента треонина (см. табл. 1).

Таблица 2

Аминокислотный состав источников ростовых факторов

Аминокислота	Аминокислотный состав источников ростовых факторов, г/л				
	Гидролизат «Провита»	Гидролизат пекарских дрожжей	Кукурузного экстракта	Гидролизат кормовых дрожжей	Гидролизат паприна
Ala	3,44	1,56	8,47	2,38	1,80
Val	2,93	1,67	4,86	3,05	1,74
Gly	3,71	1,28	4,78	2,16	1,59
He	2,6	1,69	3,05	2,34	1,78
Leu	4,90	2,22	8,35	2,49	2,92
Pro	3,72	1,17	9,09	2,56	1,75
Thr	2,65	1,17	4,21	2,25	1,12
H-Ser	3,71	0,92	10,84	3,27	1,67
Met	0,89	0,53	2,05	0,61	0,23
Phe	2,71	1,51	3,06	1,95	1,75
Asp	5,6	3,57	7,46	4,93	4,52
Glu	10,2	5,36	16,17	8,46	6,13
Orn	0,31	-	-	-	-
Lys	3,15	3,23	1,86	3,53	3,21

На основании данных табл. 1 можно предположить, что при накоплении биомассы продуцента *E. coli* определяющее значение имеет концентрация в питательной среде L-изолейцина. Однако, как видно из табл. 1, 2, для накопления того же количества биомассы продуцента L-треонина в питательную среду необходимо вносить в четыре раза больше кукурузного экстракта, чем, например, гидролизата пекарских дрожжей. Вместе с тем содержание изолейцина в кукурузном экстракте практически в два раза выше по сравнению с гидролизатом пекарских дрожжей (см. табл. 2). Экспериментальные данные (см. табл. 1 и 2) свидетельствуют о том, что изолейцин оказывает стимулирующее действие на рост биомассы продуцента L-треонина, однако только в том случае, когда данная аминокислота является единственным ИРФ в посевной среде. Если же изолейцин входит в состав источника ростовых факторов, то линейной зависимости между накоплением биомассы штаммом-продуцентом и концентрацией изолейцина не наблюдается.

Проведенный нами анализ аминокислотного состава культуральной жидкости, полученной в процессе выращивания посевного материала, показал, что при накоплении биомассы продуцента происходит утилизация практически всех аминокислот, входящих в состав питательных сред. Также установлено, что культуральная жидкость, полученная после выращивания продуцента треонина на питательных средах с определенными ростовыми факторами, имеет повышенное содержание аспарагиновой кислоты и гомосерина (табл. 3).

Таблица 3

**Аминокислотный состав культуральной жидкости, полученной в процессе
выращивания посевного материала продуцента треонина**

Аминокислота	Аминокислотный состав культуральной жидкости, г/л				
	Гидролизат «Провита»	Гидролизат пекарских дрожжей	Кукурузный экстракт	Гидролизат кормовых дрожжей	Гидролизат паприны
Ala	0,26	0,49	0,91	0,23	0,40
Val	0,11	0,06	0,27	0,17	0,27
Gly	1,05	0,95	1,94	0,14	0,56
Ile	0,23	0,14	0,28	0,2	0,34
Leu	0,19	0,2	0,64	0,37	0,58
Pro	0,53	0,61	0,60	0,24	0,31
Thr	0,71	0,12	0,28	0,30	0,12
H-Ser	0,25	1,43	0,85	0,91	0,84
Met	0,02	0,12	0,19	0,02	0,03
Phe	0,15	0,17	0,25	0,35	0,42
Asp	0,14	4,43	0,25	0,78	0,67
Glu	0,57	0,06	0,98	0,11	0,10
Orn	0,12	-	-	-	-
Lys	0,01	0,35	0,09	0,23	0,07

Анализ данных литературы показывает, что указанные аминокислоты участвуют в процессе биосинтеза треонина в микробной клетке [8], который протекает в несколько этапов (рис. 1).

В дальнейших исследованиях посевной материал продуцента *E. coli*, полученный на питательных средах, содержащих исследуемые источники ростовых факторов, испытывали в процессе биосинтеза L-треонина 8 лабораторном ферментере. В качестве примера на рис. 2 представлена динамика накопления треонина и утилизация Сахаров (РВ) штаммом-продуцентом *E. coli* XT-99 при засеве питательной среды посевным материалом, полученным с использованием двух различных источников ростовых факторов: гидролизата паприны и гидролизата пекарских дрожжей. Оптическая плотность посевного материала составляла 0,23-0,25 ед. ОП.

Очевидно, что качество посевного материала имеет важное значение в процессе биосинтеза L-треонина. Анализ полученных данных (см. рис. 2)

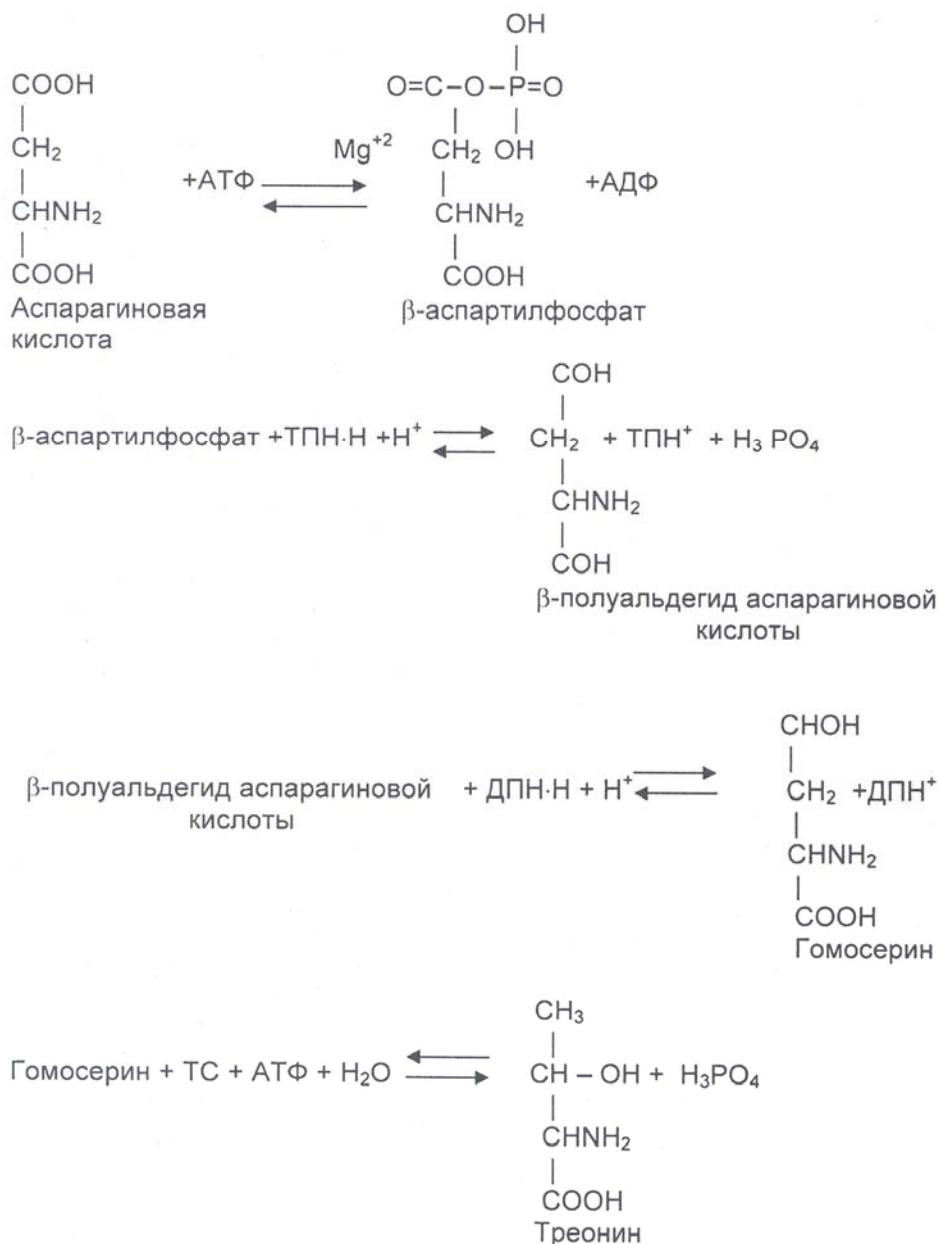


Рис. 1. Биохимический путь синтеза треонина в микробной клетке:
 АТФ – аденозинтрифосфорная кислота, АДФ – аденозинмонофосфорная кислота,
 ТПН – трифосфопиридиннуклеотид, ДПН – дифосфопиридиннуклеотид, ТС – треонинсинтетаз

свидетельствует об определяющей роли аспарагиновой кислоты и гомосерина в процессе биосинтеза L-треонина. Так, при использовании в процессе биосинтеза посевного материала, содержащего гидролизат пекарских дрожжей, максимальный уровень накопления целевой аминокислоты (1) составил порядка 53-55 г/л за 30-32 ч ферментации. Как видно из данных табл. 3, посевная среда в данном эксперименте содержала в своем составе аспарагиновую кислоту и гомосерин - аминокислоты, предшествующие биосинтезу L-треонина. При засеве ферментационной питательной среды посевным материалом, выращенным с использованием гидролизата лаприна, который не стимулирует образование аспарагиновой кислоты и гомосерина (см. табл. 3), продуктивность процесса биосинтеза треонина снижается практически в 1,7 раза (2). Динамика утилизации источников углеродного

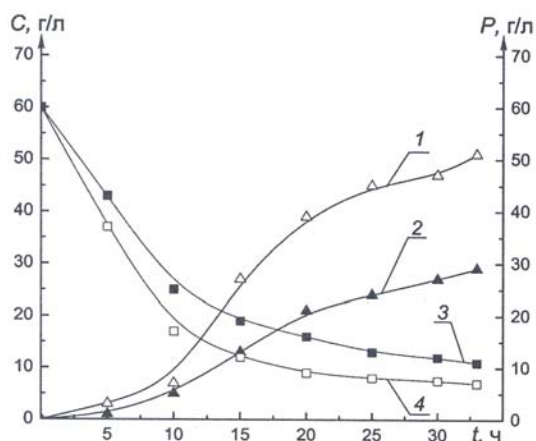


Рис. 2. Динамика накопления треонина (1, 2) и утилизация редуцирующих веществ (3, 4) при биосинтезе треонина культурой *E. coli* в лабораторном ферментере. Среда: 1, 4 — на основе гидролизата кормовых дрожжей, 2, 3 — на основе гидролизата паприны

питания (3, 4) также показала, что при использовании в процессе биосинтеза *L*-треонина посевного материала необходимого качества существует возможность увеличить выход треонина с единицы затраченного сырья и снизить себестоимость его производства.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшую активность штамм-продуцент *E. coli* проявляет при использовании посевного материала, содержащего в своем составе аспарагиновую кислоту и гомосерин - аминокислоты, предшествующие образованию треонина. Установлена также стимулирующая роль

изолейцина при выращивании биомассы продуцента. Особенно четко роль изолейцина проявляется, когда эта аминокислота выступает единственным источником ростового фактора в питательных средах.

1. Патов В.К., Любина А.Ю. Получение аминокислот и их роль в проблеме питания. М., 1979. С. 58.

2. Нормирование кормления сельскохозяйственной птицы по доступным аминокислотам. Сергиев Посад, 2000. С. 22.

3. Григорьев Ю.Г. //Вопросы питания 1982. №5. С.23.

4. Якубе Х.-Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1985.

5. Debarov V.G. Overproduction of microbial products. London, 1982.

6. Босенко А.М., Якимович Н.Н., Шиялова А.П., Якимович И.В. // Тез. докл. всесоюз. симпози. «Биоконверсия растительного сырья». Рига. 1982. Т. 1 С. 40.

7. Yukawa H., Terasawa M. //Chem. Econ. Review. 1981. Vol. 13. №9. P. 16.

8. Eggeling I., Prefferle W., Sahm A. Basic biotechnology. Cambridge, 2002. P. 294.

Поступила в редакцию 27.06.06

Николай Николаевич Якимович - старший научный сотрудник, кандидат технических наук.

Александр Александрович Бильдюкевич - младший научный сотрудник.

Ирина Васильевна Якимович - научный сотрудник.