

УДК 579.222; 663.1

## ПРОЦЕСС БИОСИНТЕЗА ЛИЗИНА ШТАММОМ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* B-11167 НА ОСНОВЕ СРЕД, СОДЕРЖАЩИХ ГИДРОЛИЗАТ ПШЕНИЧНОГО ГЛЮТЕНА

Сиротин А. А., Глухарева Н. А., Оспищева Н. В., Бондаренко В. В., Резун А. П.,  
Зенинская Н. А.

*ФГАО УВПО Белгородский национальный исследовательский университет (Белгород, Россия, ул. Победы, д. 85); e-mail: ospisheva@bsu.edu.ru*

Получен лизин микробиологическим путем с помощью штамма микроорганизма *Corynebacterium glutamicum* B-11167 в ферментере Minifors. В ходе ферментации осуществляли определение динамики содержания лизина и глюкозы в культуральной жидкости. Содержание лизина определили методом капиллярной хроматографии. Для выявления содержания глюкозы использовали поляриметрический метод. Получены питательные среды на основе гидролизата пшеничного глютенa. Выявлена положительная динамика роста штамма *C. glutamicum* B-11167. При этом продукция лизина составила 30 г/л за 42 часа ферментации. Установлено, что добавление в качестве фактора роста (азотного компонента среды) гидролизата пшеничного глютенa в составе подпитки II дает хорошие результаты в отношении конкретного исследуемого штамма *C. glutamicum* B-11167 и подтверждает перспективность его применения как заменителя кукурузного экстракта.

Ключевые слова: лизин, ферментация, гидролизат пшеничного глютенa, *Corynebacterium glutamicum*.

## THE BIOSYNTHESIS OF LYSINE STRAIN *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* B-11167-BASED MEDIUM CONTAINING WHEAT GLUTEN HYDROLYZATE

Sirotin A. A., Glukhareva N. A., Ospisheva N. V., Bondarenko V. V., Rezun A. P.,  
Zeninskaya N. A.

*FSA EIHPЕ Belgorod National Research University (Belgorod, Russia, Victory, 85); e-mail: ospisheva@bsu.edu.ru*

Lysine obtained microbiologically using microorganism strain *Corynebacterium glutamicum* B-11167 in a fermenter Minifors. During the fermentation was carried out certain dynamics lysine and glucose in the culture fluid. Lysine determinant by was defined capillary chromatography. To detect the glucose the polarimetric method was used. Culture media were obtained on the basis of wheat gluten hydrolyzate. The positive dynamics of growth of the strain *C. glutamicum* B-11167 was revealed. The products of lysine was 30 g / l for 42 hours of fermentation. The addition of as a growth factor (nitrogen component environment) hydrolyzate of wheat gluten in the recharge II works well on a particular test strain of *C. glutamicum* B-11167 and confirms the prospects of its use as a substitute for corn steep liquor.

Keywords: lysine fermentation, hydrolyzed wheat gluten, *Corynebacterium glutamicum*.

### Введение

Лизин входит в триаду незаменимых аминокислот и жизненно необходим для полноценного питания как человека, так и сельскохозяйственных животных. Эта незаменимая аминокислота жизненно важна для построения критических белков организма. И используется организмом в ряде физиологических процессов в иммунной, мышечной и нервной системах человека и животных. Недостаток лизина в организме вызывает негативные последствия, такие как слабость, повреждение сосудов глаз, выпадение волос, снижение мышечной массы, потерю кальция, снижение иммунитета к вирусным инфекциям, а также анемию и проблемы в репродуктивной сфере [1]. Суточная потребность человека в лизине составляет около 5 г. Большинство населения нашей страны из-за нарушения качественных и количественных параметров питания не получает оптимального количества

лизина с пищей. Это определяет необходимость использования пищевых добавок, включающих лизин, как в рационе человека, так и сельскохозяйственных животных.

Получение аминокислот производится посредством гидролиза естественных продуктов, содержащих белки (например, отходов птицеперерабатывающих производств), а также путем химического, ферментативного и микробиологического синтеза. Наиболее распространенным в настоящее время является микробиологический синтез аминокислот.

Современные тенденции развития науки в биотехнологическом направлении предполагают разработку новых ресурсосберегающих технологий, позволяющих увеличить объем производимой продукции при сохранении её высокого качества. Повышение рентабельности производства и улучшение качества готовой продукции может быть обеспечено совершенствованием технологий, играющих важнейшую роль в обеспечении ключевых биотехнологических процессов [4,5,6,7].

В последнее время большое распространение получили лабораторные ферментационные комплексы, которые используются для исследования процессов культивирования продуцентов различных ценных веществ. На таких установках проводятся серии опытов для получения новых штаммов и исследования уже существующих. Большую роль играют эксперименты по определению оптимальных условий для ферментации того или иного продукта – поиск зависимостей температуры, pH,  $pO_2$ , которые обеспечивают максимальную удельную производительность биореактора, минимальное количество побочных продуктов, состав культуральной жидкости, обеспечивающий дешевое выделение целевого продукта. Факторами воздействий обычно выступают концентрации различных реагентов и расходы подпиток, расход воздуха на аэрацию.

Для проведения процессов биосинтеза различных продуктов необходимы 2 основных компонента сред: источник углерода (углеводы) в качестве энергетического субстрата и источник органического азота в качестве фактора роста. В качестве источника углерода в ферментационных средах довольно часто используют ферментоллизаты крахмала, получаемые непосредственно на стадии производства биопродуктов из зерна пшеницы мягких сортов [7]. Современный микробиологический синтез аминокислот основан на питательных средах, содержащих мелассу (отход сахарного производства), кукурузный экстракт и минеральные соли. Кроме мелассы прибегают к таким источникам углерода, как гидролизаты древесины, целлюлозы, казеина и соевая мука.

Микробиологический процесс производства лизина аналогичен схеме получения глутаминовой кислоты, однако использование ауксотрофных микроорганизмов требует специального состава питательных сред, которые подбираются индивидуально для каждого штамма. Очень важно также осуществлять на стадии ферментации стабилизацию основных

параметров культуры в строгом соответствии с технологическим регламентом данного производства, так как выход лизина зависит от температуры среды, концентрации кислорода, длительности ферментации, дозы и возраста посевного материала [1].

По последним данным испытания ферментолизата глютена и кукурузного экстракта в качестве ростовых факторов на различных биотехнологических объектах (биосинтез лизина, и других аминокислот и антибиотиков) выявили возможность эффективной замены кукурузного экстракта на ферментолизат пшеничного глютена (продукта глубокой переработки зерна) и подтверждена возможность использования ферментолизата глютена в качестве азотсодержащих компонентов ферментационных сред для процессов биосинтеза лизина и других аминокислот [5]. При этом использование ферментолизата глютена в качестве ростового фактора позволяет повысить выход лизина при культивировании *Corynebacterium glutamicum* на 10–15 % по сравнению с использованием кукурузного экстракта [3]. Разработаны и испытаны альтернативные технологии биосинтеза астаксантина и L-лизина, использующие в качестве углеводной и азотистой части ферментационных сред продукты переработки зерна [2].

Цель исследования – выявить влияние использования гидрализата пшеничного глютена в биосинтезе лизина штаммом *Corynebacterium glutamicum* В-11167 в ферментере Minifors.

#### **Объекты и методы исследования**

Для биосинтеза лизина использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11167. Общая характеристика продуцента: штамм-продуцент на основании генетического анализа 16S-РНК определен как штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11167.

Культурально-морфологические признаки включают следующие характеристики: клетки овальной формы, размером 1,2-1,5x 0,8-1,0 мкм, неподвижные, грамположительные, спор не образуют; через 3 сут. роста при 30 °С на МПА образуют колонии диаметром 4 мм, желтовато-кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная. При посеве штрихом через 1 сут. рост слабый, край гладкий, поверхность матовая, цвет кремовый. При посеве на глюкозоминеральной среде Гловера, содержащей биотин и тиамин, через 2 сут. роста при 30 °С колонии 1,5–2 мм, край ровный, структура однородная, консистенция тестообразная, поверхность гладкая, цвет колоний светло-кремовый. Рост штриха на этой среде через 2 сут. умеренный.

Физиолого-биохимические признаки *Corynebacterium glutamicum* В-11167 характеризуются аэробным способом дыхания; хорошим ростом на глюкозе, сахарозе, мальтозе, маннозе, уксусной кислоте, несколько хуже на этиловом спирте. Не растет на лактозе, раффинозе. Азот усваивает в форме солей аммония и мочевины. Рост наблюдается

при температуре 24:35 °С, оптимальная температура 30:32 °С. Уровень рН среды, при котором наблюдается рост от 6 до 8,5, оптимальное значение рН 6,8-7,2. При росте в минимальной среде нуждается в биотине и тиамине.

Генетические характеристики. Штамм устойчив к аналогу лизина S-(2-аминоэтил)-L-цистеину (АЭЦ). Длительное хранение штамма-продуцента лизина *Corynebacterium glutamicum* В-11167 осуществляют при  $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . В качестве протекторной среды используют 20 % р-р глицерина в воде [3].

Методы исследования. Технология биосинтеза лизина с помощью штамма *Corynebacterium glutamicum* В-11167 в ферментере Minifors состоит из следующих основных этапов:

1) Приготовление питательных сред. В качестве источника углерода при производстве лизина использовали раствор глюкозы. Также могут для этого штамма использоваться как различные сахара (глюкоза, сахароза), так и различное сахаросодержащее сырье (меласса, сахарный сироп, крахмальные патоки и т.п.). Патоки должны соответствовать ГОСТу Р 52060-2003 и содержать 71 – 78 % углеводов (глюкозы 71 %) [3]. Подготовка и стерилизации посуды: пробирки, колбы, ватные пробки бюретки, пипетки, цилиндры, стеклянные палочки, наконечники для трубок вымыты дистиллированной водой, завернуты в пергамент и помещены в сухожаровой шкаф, стерилизовались при температуре 170 °С в течение 60 мин.

В качестве источника ростовых факторов использовали гидролизат пшеничного глютена (ГПГ). В качестве источника ростовых факторов для штамма *Corynebacterium glutamicum* В-11167 также можно использовать следующие гидролизаты – гидролизат соевого шрота (фирмы “Kawasaki”), гидролизат кукурузного глютена, гидролизат соевого изолята, гидролизат пшеничного глютена, а также казаминовые кислоты (ГосНИИ «Генетика»). Затем последовательно готовятся следующие среды: жидкая питательная среда LB, среда для выращивания инокулята, среда для ферментера в колбах, и штамм *Corynebacterium glutamicum* В-11167 последовательно пересеивается на эти среды [3].

Следующие этапы: 2) модернизация параметров культивирования продуцента в ферментере и 3) мониторинг динамики содержания лизина и глюкозы в культуральной жидкости. Содержание лизина определили методом капиллярной хроматографии. Контроль содержания глюкозы определяли поляритрическим методом.

### **Результаты и их обсуждение**

Проведено три цикла ферментации по 18–46 часов в зависимости от обеспеченности компонентами и факторами, регулирующими условия биосинтеза. Параллельно проводили периодический контроль шести параметров: температура, рН среды, уровень аэрации, концентрация глюкозы, содержание амидного азота, накопление лизина.

Каждый цикл включал следующие этапы: подготовка и стерилизации посуды, приготовление и стерилизация питательных сред, получение культуры *Corynebacterium glutamicum* В-11167 на твердой агаризованной среде; получение посевного материала в пробирках, получение рабочей культуры в колбах, синтез лизина в ферментере Minifors, сушка продукта и определение содержания лизин сульфата.

В соответствии с требованием методики приготовлены исходные растворы и различные типы сред: 0,25 л жидкой питательной среды LB; 0,150 л агаризованной среды LB с глюкозой и биотином; 1 л среды для выращивания инокулята в колбах; 0,64 л среды для ферментера.

Среды и отдельные компоненты (раствор глюкозы) стерилизовались в автоклаве в отдельной посуде, разливались стерильно в ламинарном боксе.

Контроль морфологических свойств культуры проводили визуально через 72 ч роста. При росте на агаризованной среде продуцент образовывал круглые колонии диаметром 2–4 мм, желтовато-кремовые, поверхность гладкая, форма выпуклая, край ровный, структура однородная тестообразная. При микрокопировании культура представляла собой грамположительные овальные бактерии размером 1,0-1,5x0,6-0,8 мкм, неподвижные, спор не образовывалось.

Производили пересев для выращивания посевного материала в пробирках. Посевной материал выращивали посевом на жидкую среду LB в пробирках в шейкере-инкубаторе при скорости вращения 240 об/мин, температуре 30 °С в течение 20 ч.

Полученный посевной материал вносили стерильно в ламинарном шкафу в пробирки, емкостью 50 мл, содержащие 0,003 л стерильной ферментационной среды. Затем в пробирки засеивали в ламинарном шкафу микробиологической петлей из расчета две петли на колбу, содержащие 0,030 л стерильной ферментационной среды. Ферментацию проводили при тех же условиях в шейкере-инкубаторе.

Выращивание рабочей партии культуры. Для выращивания инокулята использовали колбы Эрленмейера вместимостью 0,5 л со средой для выращивания инокулята 0,050 л Колбы (3 шт.).

Культивирование в колбах вели в шейкер-инкубаторе при скорости вращения 240 об/мин, температуре 31 °С в течение 8 ч. В процессе культивирования уносимая влага составляла до 8–10 % от объема среды.

Готовый инокулят в количестве 0,050 л с оптической плотностью не менее 30 ед. и при отсутствии посторонней микрофлоры использовали на следующей стадии. Забракованные колбы с посевным материалом автоклавировали.

На второй стадии использовали колбы 0,75 л, выращивания проводили в шейкер-инкубаторе при температуре 31 °С, парциальном давлении кислорода в среде – не менее 20 %, рН в диапазоне от 6,8 до 7,2, продолжительность выращивания – 16 час.

Биосинтез лизина в лабораторном ферментере Minifors. После заправки ферментера средой и емкостей для подпитки стерильно вносили инокулят через асептический соединитель в объеме 0,150 л.

Значение рН питательной среды после стерилизации доводили до 7,0 с помощью 12,5 %-ного раствора аммиака. В головку перистальтического насоса, установленного на ферментере с маркировкой «Base», вставляли шланг от флакона с 12,5 % раствором аммиака, закрепляли его, и в ручном режиме работы насоса заполняли весь шланг раствором. Флаконы с 6 % раствором серной кислоты и двумя подпитками: подпитка I – 50 % раствор глюкозы (содержание 885 г/л глюкозы) и подпитка II (содержание раствора 885 г/л глюкозы 80 мл/л гидролизата пшеничного глютена) подсоединяли аналогично. В ходе ферментации в ферментер, по мере надобности, вносили пеногаситель Полиметилсилоксан.

Парциальное давление кислорода  $p_{O_2}$  с помощью оборотов мешалки (600–700) об/мин поддерживали на уровне не ниже 20 %. Отработанный воздух через фильтр тонкой очистки направлялся в вытяжную вентиляцию.

Перед засевом выставляли следующие параметры культивирования: добавляли объем среды 640 мл., температура – 31 °С, расход воздуха – 1.0 л/мин, обороты мешалки – 600 об/мин, объем инокулята – 160 мл.

Продолжительность биосинтеза составляла от 18 до 46 ч. Во время процесса культивирования осуществляли контроль параметров ежедневно.

Каждые два часа отбирали пробы и определяли концентрацию глюкозы в культуральной жидкости методом капиллярного электрофореза. По достижении концентрации глюкозы в культуральной жидкости 20–30 г/л включали подачу подпитки I со скоростью 8 мл/ч. Концентрацию глюкозы удерживали в интервале 25–40 г/л, для чего по необходимости осуществляли дробные добавки глюкозы в ферментер, при этом увеличивая или уменьшая скорость подачи подпитки.

Через 13 ч культивирования прекращали подачу подпитки I и начинали подачу подпитки II. Подачу осуществляли циклически (3 подачи со скоростью 13 мл/ч в течение 2 час каждая с двухчасовыми паузами). По окончании цикла добавки определяли концентрацию глюкозы в ферментере. Если она составляла 20–40 г/л, включали подпитку со скоростью 8 мл/ч и подавали ее в течение 12 час. Если концентрация глюкозы выше указанных пределов, ожидали, когда она упадет до необходимого значения, и вновь включали подпитку. Общая концентрация поданной глюкозы составляла до 300 г/л.

Отобранные пробы культуральной жидкости проверяли на постороннюю микрофлору, продуктивность и оптическую плотность, на содержание фосфора, аминного и аммонийного азота. При визуальном микроскопическом исследовании культура представляла собой скопление грамположительных палочек, типичных для *Corynebacterium glutamicum*.

При замедлении положительной динамики изменения концентрации лизина в культуральной жидкости ферментацию останавливали. В первом цикле это произошло через 18 часов, во втором – 36 и 46 часов – в третьем. К этому моменту продуктивность составила в первом цикле 2,7 г/л лизина, во втором – 15,0 г/л и в третьем 30,0 г/л. К концу ферментации оптическая плотность культуральной жидкости составляет в первом цикле 2,23, во втором цикле 1,89 и в третьем цикле 2,22 единиц оптической плотности, измеренных на спектрофотометре при 590 нм и толщине кюветы 1 см.

По окончании процесса культуральную жидкость сливали из ферментера через пробоотборник, предварительно повысив давление в ферментере путем перекрывания линии выхода воздуха. Колбу вместимостью 1,5 л с культуральной жидкостью передавали для определения содержания сухих веществ весовым методом и лизин сульфата.

Конечный объем культуральной жидкости составил в первом 0,950 л, во втором 0,940 л и 1,200 л – в третьем цикле.

### **Выводы**

В ходе проведенных исследований выявлена положительная динамика роста штамма *Corynebacterium glutamicum* В-11167 и продукция им лизина составила 30 г/л за 42 часа ферментации, что не является максимальной. Установлено, что добавление в качестве фактора роста (азотного компонента среды) гидролизата пшеничного глютена в составе подпитки II дает хорошие результаты в отношении конкретного исследуемого штамма *Corynebacterium glutamicum* В-11167 и подтверждает перспективность его применения как заменителя кукурузного экстракта. Дальнейшие исследования предполагают выявление доз и динамики внесения гидролизата пшеничного глютена на конечный выход продукции лизина и установление зависимостей состава питательных сред по этому компоненту.

### **Список литературы**

1. Волова Т. Г. Биотехнология. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
2. Герман Л. С. Комплексная технология переработки некондиционного зерна как исходная стадия биотехнологических производств: Автореф. дис... канд. техн. наук: 03.01.06. – М., 2012. – 20 с.

3. Получение лизина на основе продуктов глубокой переработки зерна: лабораторный регламент ЛР-00479942-1-2011 / ФГИУ ГосНИИгенетика. – М., 2011. – 35 с.
4. Саргсян К. М. Влияние различных параметров процесса культивирования на биосинтез лизина // Научная конференция студентов и молодых учёных МГУИЭ: тезисы докл.: В 2 т. (Москва, 21-23 апр. 2010 г.). Т.1. – М.: МГУИЭ, 2010. – С. 19 – 20.
5. Федотова Н. В. Разработка технологии получения из зернового сырья азотсодержащих компонентов для процессов ферментации: Автореф. дис... канд. техн. наук.: 03.00.23. – М., 2009. – 19 с.
6. Федотова Н. В. Ферментолитат глютена как ростовой фактор процесса ферментации / Н. В. Федотова, В. В. Бирюков, А. Н. Поляков, Л. С. Герман // Биотехнология. – 2009. – № 4. – С. 64-68.
7. Шотин, А. Б. Автоматизация научных исследований процессов биосинтеза: Автореф. дис... канд. техн. наук: 05.13.06. – М., 2010. – 18 с.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках субподрядного договора по договору 13.G25. 31. 0069 от 22.10.2010 г.*

**Рецензенты:**

Тохтарь Валерий Константинович, доктор биологических наук, профессор, директор ботанического сада НИУ «Белгородского государственного университета», г. Белгород.

Сорокопудов Владимир Николаевич, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии фармацевтического факультета НИУ «Белгородского государственного университета», г. Белгород.