

УДК 579.222

ВЛИЯНИЕ КОМПОНЕНТОВ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ НА БИОСИНТЕЗ ТРИПТОФАНА

С. М. Шульга
А. Ф. Ткаченко
Е. А. Тигунова
Н. Е. Бейко
А. И. Хоменко

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики»
НАН Украины, Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Проведен поиск штамма-продуцента триптофана среди бактериальных культур из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» Института пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины. Отобран продуцент триптофана *Corynebacterium glutamicum* Т-3, который накапливает 4 г/дм³ триптофана в культуральной жидкости. Исследовано влияние источников углерода на синтез триптофана. Наибольшая активность синтеза триптофана выявлена при использовании мелассы. Рассмотрено участие в биосинтезе триптофана некоторых его предшественников: индола, индолпириновинной кислоты, индолмолочной кислоты; смесей: индол + L-серин, индол + L-цистеин, индол + DL-аланин. Внесение предшественников синтеза триптофана в среду стимулирует его накопление в культуральной жидкости. Показана возможность получения триптофана экономически доступным способом при условии замены в среде дорогостоящих предшественников на более дешевое сырье — мелассу.

Ключевые слова: триптофан, *Corynebacterium glutamicum* Т-3, биосинтез, аминокислоты.

Одним из наиболее перспективных методов получения аминокислот является их синтез с помощью микроорганизмов. Таким способом были получены аминокислоты, синтез которых из предшественников является экономически целесообразным. Примером может быть получение аспарагиновой кислоты из фумарата, а также аминокислот, синтез которых из-за отсутствия предшественников у природных микроорганизмов не наблюдается [1–3].

Получение триптофана из предшественников представляет собой направленный и регулируемый процесс биосинтеза. Наиболее эффективным способом является синтез триптофана дрожжами из антралиновой кислоты, однако он имеет определенные недостатки. Значительная токсичность не позволяет вводить ее в среду в количестве, необходимом для экономически целесообразного синтеза триптофана, а почасовое введение усложняет процесс.

Целью работы был поиск продуцента триптофана среди бактериальных культур и определение условий увеличения продуктивности его синтеза.

Материалы и методы

Объектом исследований служили бактерии *Corynebacterium glutamicum* штаммов Т-1, Т-2, Т-3, из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» Института пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины.

Культуры хранили на мясопептонном агаре (мясопептонный бульон с 2% агара). Культивирование бактерий проводили на обогащенном мясопептонном агаре (состав: мясопептонный бульон — 100 см³, глюкоза — 0,1 г, дрожжевой экстракт — 0,25 г, агар — 2%) при 30 °С в течение суток, после чего переносили клетки из расчета 15 млн КОЕ/см³ среды в стерильные колбы объемом 100 см³ с 30 см³ жидкой среды следующего состава (г/дм³): глюкоза — 20, (NH₄)₂SO₄ — 20, KH₂PO₄ — 1, MgSO₄·7H₂O — 1, солодовый экстракт — 10, мел — 1. Культивирование бактерий осуществляли в шейкере-инкубаторе BIOSAN ES-20 (Латвия) при 240 об/мин и температуре 30 °С в течение 24 ч.

Для определения влияния различных источников углеводов и биологически активных веществ на синтез триптофана бактерии выращивали на энзиматической среде основного состава (г/дм³): пептон — 10, дрожжевой экстракт — 5, хлористый натрий — 5, сульфат аммония — 0,5. В среду вносили соответствующее количество исследуемых веществ в зависимости от поставленной задачи (г/дм³): мелассы — 2–20; сахарозы — 20; глюкозы — 20; индола — 0,15–0,5; серина — 0,3; индолпировиноградной кислоты — 0,5; индолмолочной кислоты — 0,5; смесей (в соотношении соответственно): индол + L-серин (1:2); индол + L-цистеин (1:2); индол + DL-аланин (1:2).

Качественные показатели мелассы определяли по ГОСТ 30561-98. Для исследования была взята меласса с такими показателями (%): сухие вещества — 81,2; сахароза — 50; доброкачественность (соотношение количества сахара к сухим веществам) — 61,6; рН — 6,8.

Количественный и качественный состав аминокислот мелассы устанавливали с помощью аминокислотного анализатора ААА 400 (Чехия).

После выращивания, по истечении 1–7 сут, клетки осаждали центрифугированием и в культуральной жидкости выявляли триптофан методом тонкослойной хроматографии на пластинках Силуфол UV-254 (Чехия).

Статистическая обработка была сделана с помощью программы Microsoft Excel. Все опыты проводились в 3 повторах.

Результаты и обсуждение

Из исследуемых штаммов *C. glutamicum* Т-1, Т-2, Т-3 наиболее продуктивным оказался штамм Т-3. При одинаковых условиях культивирования штаммы Т-1 и Т-2 синтезировали триптофан в концентрациях 1,2 и 2,0 г/дм³ соответственно, а штамм Т-3 — 4 г/дм³ (рис. 1).

Все дальнейшие исследования проводили со штаммом Т-3.

В работе [4] показано, что микроорганизмы, накапливающие триптофан в культуральной жидкости, могут осуществлять этот процесс при использовании его предшественников. Штамм *C. glutamicum* Т-3 синтезировал триптофан из индолпировиноградной кислоты и из других производных индола (табл. 1).

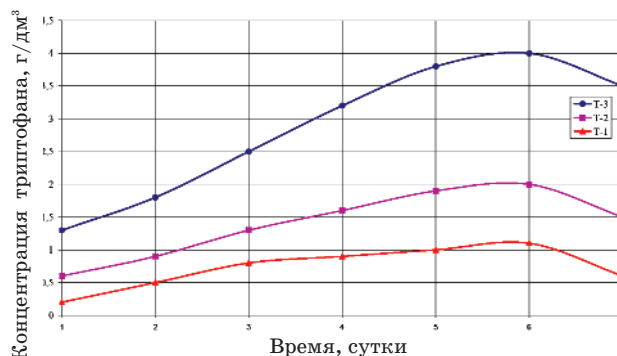


Рис. 1. Синтез триптофана *C. glutamicum* штаммами Т-1, Т-2, Т-3

(в качестве контроля использовали чистую среду, данные достоверны по отношению к контролю)

Таблица 1. Синтез триптофана из различных предшественников

(в качестве контроля использовали чистую среду, данные достоверны по отношению к контролю)

Выход	Индол	Индолпировиноградная кислота (ИПК)	Индолмолочная кислота (ИМК)
г/дм ³ среды	0,282	0,215	0,185
% от введенного предшественника	57,8	43,9	38,3

Относительно более высокая интенсивность синтеза триптофана наблюдалась при внесении в среду индола (0,282 г/дм³) в сравнении с его производными — ИПК и ИМК (концентрация триптофана 0,215 г/дм³ и 0,185 г/дм³, соответственно). Выход триптофана при внесении в среду индолилпировиноградной кислоты оказался выше по сравнению с индолилмолочной. Возможно, в данном случае оксикислота (индолилмолочная) сначала подвергалась дегидратации с образованием своего кетоаналога (индолилпировиноградной кислоты), а последний путем восстановительного аминирования превращался в триптофан.

Внесение отдельных дополнительных аминокислот в среду в разной степени активирует синтез триптофана [5, 6].

Нами исследовано влияние серина, а также цистеина и аланина (аминокислот с близкими молекулярными структурами) на биосинтез триптофана. Аминокислоты были взяты в избытке по отношению к индолу, чтобы «сдвинуть» реакцию в сторону образования триптофана.

Таблиця 2. Влияние аминокислот на синтез триптофана

(в качестве контроля использовали чистую среду, данные достоверны по отношению к контролю)

Выход	Индол	Индол + L-серин (1:2)	Индол + L-цистеин (1:2)	Индол + DL-аланин (1:2)
г/дм ³ среды	0,285	0,320	0,311	0,284
% от введенного предшественника	57,9	64,3	61,3	57,8

Из результатов, представленных в табл. 2, следует, что серин и, в меньшей степени, цистеин увеличивали выход триптофана. Это можно объяснить тем, что необходимое количество серина (или цистеина) поступает из внутриклеточного аминокислотного пула, поэтому его избыток приводит к повышению интенсивности синтеза триптофана. Аланин практически не ускорял синтез триптофана. Полученные результаты подтверждают предположение авторов [5, 6] о стимулирующем действии аминокислот на синтез триптофана.

Источником энергии, необходимой для жизнедеятельности микроорганизмов, могут быть различные углеродсодержащие соединения, главными из которых являются углеводы. Ранее в работах [6–8] показано, что на синтез триптофана помимо приведенных выше факторов оказывали влияние и источники углерода. Для оптимизации процесса биосинтеза триптофана необходимо было подобрать определенный источник углерода.

При культивировании продуцента на различных углеводах (рис. 2) установлено, что при оптимальных условиях выращивания накопление биомассы и синтез триптофана находятся в прямой зависимости и не зависят от используемого источника углерода.

При внесении одинакового количества углеводов (20 г/дм³) наибольшее накопление биомассы и триптофана наблюдается на среде с мелассой (для биомассы — 16 г/дм³, для триптофана — 7,7 г/дм³). Наименьшие показатели накопления биомассы и синтеза триптофана были на среде с глюкозой — 11,4 г/дм³ и 7,4 г/дм³, соответственно.

Это можно объяснить тем, что меласса представляет собой комплексную среду, состоящую из разных природных компонентов. Состав мелассы в основном представлен сахарозой (45–50%), несахарами — органическими (безазотистыми и азотсодержащи-

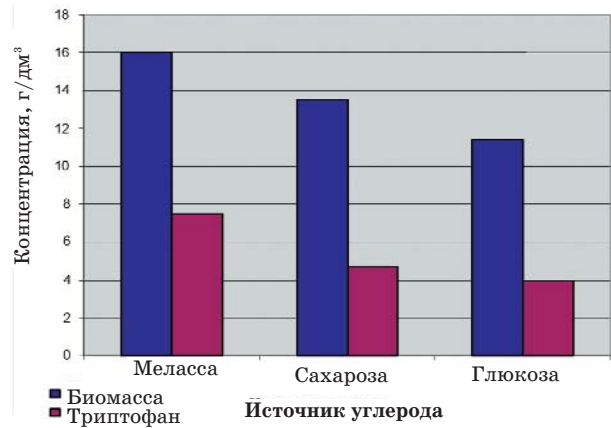


Рис. 2. Влияние источника углерода на синтез биомассы и триптофана

(в качестве контроля использовали чистую среду, данные достоверны по отношению к контролю)

ми) и неорганическими (зольными веществами) соединениями, ростовыми веществами и аминокислотами [8, 9], которые и являются источниками энергии для жизнедеятельности бактерий *C. glutamicum*.

На размножение и физиологическую активность бактерий влияет не только источник углевода, но и его количество.

Для определения минимального содержания мелассы в среде с целью интенсификации синтеза биомассы нами были проведены исследования по влиянию концентрации введенной мелассы и установлено оптимальное содержание ее в среде (рис. 3).

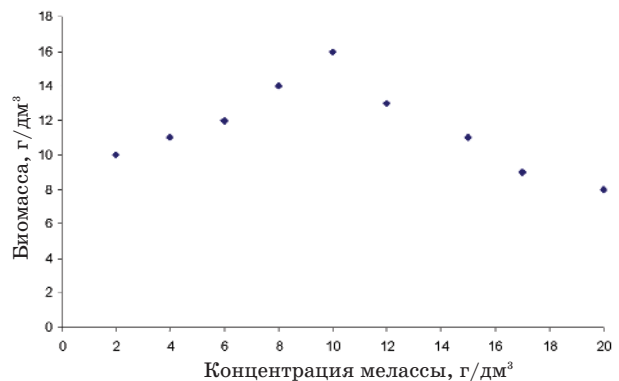


Рис. 3. Влияние концентрации введенной мелассы на синтез биомассы

(в качестве контроля использовали чистую среду, данные достоверны по отношению к контролю)

Динамика синтеза биомассы с использованием различных концентраций мелассы в среде показывает, что увеличение количества вносимой мелассы от 2 г/дм³ до 10 г/дм³ приводит к повышению прироста биомассы до 16 г/дм³. С увеличением концентрации

мелассы свыше 10 г/дм³ синтез биомассы снижался. Это можно объяснить тем, что повышенное содержание углеводов, солей и сухих веществ в среде ингибирует размножение бактерий. Определено, что оптимальное количество вносимой в среду мелассы — 10 г/дм³. При этом накапливалось максимальное (16 г/дм³) количество биомассы.

В наших опытах добавление в среду аминокислот и предшественников синтеза триптофана приводило к увеличению накопления его в среде (табл. 1 и 2). Качественный и количественный аминокислотный состав исследуемой мелассы приведен в табл. 3.

Таблица 3. Качественный и количественный состав аминокислот мелассы

Аминокислота	Количество	
	%	мг/г сухих веществ
Лейцин	0,75	9,0
Изолейцин	0,92	11,0
Фенилаланин	0,34	4,0
Валин	0,22	3,0
Метионин	0,34	4,0
Триптофан	0,25	3,0
γ-Аминомасляная кислота	1,35	17,0
Тирозин	0,75	9,0
Пролин	Следы	Следы
Аланин	1,1	14,0
Треонин	0,22	3,0
Глицин	0,35	4,0
Глутаминовая кислота	1,22	15,0
Серин	1,6	20,0
Аспарагиновая кислота	0,35	4,0
Аргинин	Следы	Следы
Гистидин	Следы	Следы
Лизин	Следы	Следы
Цистин	Следы	Следы

Присутствие в мелассе таких аминокислот, как серин, цистин и аланин, дает возможность заменить введение этих предшественников в среду мелассой, что и было показано в наших исследованиях.

Исследовано влияние состава аминокислот мелассы на продуктивность синтеза триптофана. В качестве контроля была использована среда с чистой сахарозой и предшественниками синтеза триптофана индолом и серином. Полученные результаты представлены на рис. 4.

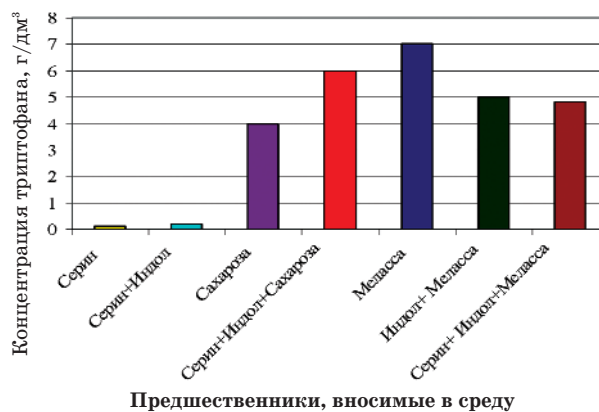


Рис. 4. Синтез триптофана на разных средах (данные достоверны по отношению к контролю)

Сравнение среды, содержащей сахарозу, со средой, в которую внесена меласса в присутствии предшественников триптофана, показало, что присутствие мелассы в этих средах ингибирует синтез триптофана.

Более высокая активность синтеза триптофана наблюдалась при введении только мелассы. В меньшей мере увеличивала выход триптофана смесь (серин + индол + сахароза). Наименьшее количество триптофана накапливалось в среде со смесью (серин + индол + меласса), т. е. дополнительное введение в среду предшественников триптофана ингибирует процесс его синтеза, а меласса содержит достаточное количество индола и серина для синтеза триптофана и не требует их дополнительного внесения в среду.

Таким образом, проведенные исследования показали, что триптофан может быть получен экономически доступным способом при условии замены в среде дорогостоящих и нестойких предшественников синтеза триптофана на более дешевое сырье — мелассу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Umbarger H. E.* Amino acid biosynthesis and its regulation // *Annu. Rev. Biochem.* — 1978. — V. 47. — P. 533–606.
2. *Lessard P., Guillouet A. S., Willis L. B., Sinskey A. J.* *Corynebacteria, brevibacteria* / The encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation. — V. 2, New York, NY: John Wiley and Sons, 1999. — P. 729–740.
3. *Mateus R. D., Alves S. S., Regalo Da Fonseca M. M.* Kinetics of L-Tryptophan Production from Indole and L-Serine Catalyzed by Whole Cells with Tryptophanase Activity // *J. of Bioscience and Biotechnology.* — 2004. — V. 97, N 5. — P. 289–293.
4. *Рубань Е. Л., Верховцева М. И., Суворов Н. Н.* Биосинтез триптофана из индола и его производных дрожжами и *Escherichia coli* // *Прикл. биохим. микробиол.* — 1975. — Т. 1, Вып. 1. — С. 74–78.
5. *Ogiew J.* On the synthesis of tryptophan by certain bacteria and on the nature of indole formation // *J. Path. Bact.* — 2000. — V. 23. — P. 224–226.
6. *Ikeda M., Katsumata R.* Hyperproduction of tryptophan by *Corynebacterium glutamicum* with the modified pentose phosphate pathway // PWS Publishing Co., Boston, MA. — 1999. — P. 86–98.
7. *Lee S. Y., Chang H. N.* High cell density cultivation of *Escherichia coli* W using sucrose as a carbon source // *Biotechnol. Let.* — 1993. — V. 15, N 9. — P. 971–974.
8. *Shasaltaneh M. D., Fooladi J., Moosavi-Nejad S. Z.* L-tryptophan production by *Escherichia coli* in the presence of Iranian can molasses // *J. Paramed. Sci.* — 2010. — V. 1, N 2. — P. 19–24.
9. *Atiyeh H., Duvnjak Z.* Production of fructose and ethanol from cane molasses using *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 36858 // *Acta Biotechnol.* — 2003. — V. 23, N 1. — P. 37–48.

ВПЛИВ КОМПОНЕНТІВ
ЕНЗИМАТИЧНОГО СЕРЕДОВИЩА
НА БІОСИНТЕЗ ТРИПТОФАНУ

*С. М. Шульга, А. Ф. Ткаченко,
О. О. Тігунова, Н. Є. Бейко,
А. І. Хоменко*

ДУ «Інститут харчової біотехнології
та геноміки» НАН України, Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Здійснено пошук штаму-продуцента триптофану серед бактеріальних культур «Колекції штамів мікроорганізмів і ліній рослин для харчової та сільськогосподарської біотехнології» Інституту харчової біотехнології і геноміки НАН України. Відібрано продуцент триптофану *Corynebacterium glutamicum* Т-3, що накопичує 4 г/дм³ триптофану в культуральній рідині. Досліджено вплив джерел вуглецю на синтез триптофану. Найбільшу активність синтезу триптофану виявлено за використання меляси. Розглянуто участь у біосинтезі триптофану деяких його попередників: індолу, індолпіровиноградної кислоти, індолмолочної кислоти та сумішей: індолу з L-серином, індолу з L-цистеїном, індолу з DL-аланіном. Внесення попередників синтезу триптофану в середовище стимулює його накопичення в культуральній рідині. Показана можливість отримання триптофану економічно доступним способом за умови зміни в середовищі високоартісних попередників на дешевшу сировину — мелясу.

Ключові слова: триптофан, *Corynebacterium glutamicum* Т-3, біосинтез, амінокислоти.

INFLUENCE OF ENZYMATIC MEDIUM
COMPONENTS ON TRYPTOPHAN
BIOSYNTHESIS

*S. M. Shulga, A. F. Tkachenko,
O. O. Tiginova, N. E. Beyko,
A. I. Khomenko*

State organization «Institute of Food
Biotechnology and Genomics» of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: Shulga5@i.ua

Bacterial cultures out of «Collection microorganism's stains and plants line for food and agriculture biotechnology» of the Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine have been studied. The tryptophan producer stains *Corynebacterium glutamicum* T-3, which produced 4 g/dm³ of tryptophan in cultural liquid were studied. Influence of some carbon source on tryptophan biosynthesis was observed. The most activity of tryptophan biosynthesis with molasses was shown. It was considered some tryptophan precursors in biosynthesis: indole, indolepyruvic acid, indolelactic acid; the following mixtures: indole + L-serine, indole + L-cysteine, indole + DL-alanine. Application of tryptophan synthesis precursors to medium stimulates tryptophan accumulation in cultural liquid. Possibility to receive economically available tryptophan was shown provided that these expensive precursors were exchanged for cheaper source, namely molasses.

Key words: tryptophan, *Corynebacterium glutamicum* T-3, biosynthesis, amino acids.