

УДК 579.222

## ІНТЕНСИФІКАЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ТРЕОНІНУ ШТАМОМ *Brevibacterium flavum* ТН-7

С. М. Шульга  
О. О. Тігунова  
А. Ф. Ткаченко  
Н. Є. Бейко  
Г. С. Андріян  
С. Г. Прийомов

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

E-mail: Shulga5@i.ua

Наукові розробки з біотехнології незамінних амінокислот спрямовано як на селекцію більш продуктивних штамів мікроорганізмів, так і на створення оптимальних умов культивування продуцентів і підбір економічно доцільної сировини для цих технологій.

Проведено пошук штаму-продуцента треоніну серед бактеріальних культур із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України. Відібрано продуцент треоніну *Brevibacterium flavum* ТН-7, що накопичував найбільшу кількість цієї амінокислоти в культуральній рідині. Найвищу активність синтезу виявлено на сахарозовмісному середовищі. Визначено відсоток (20%) посівного матеріалу, необхідний для повноцінного синтезу треоніну. Встановлено, що додавання гомосерину не стимулює синтез треоніну. Підібрано оптимальні умови культивування та стимулятори, що інтенсифікували біосинтез.

**Ключові слова:** треонін, *Brevibacterium flavum* ТН-7, біосинтез, амінокислоти.

Вивчення механізму регуляції ензиматичних процесів з використанням культур мікроорганізмів дає змогу вибрати оптимальне середовище вирощування для забезпечення підвищення виходу кінцевого продукту [1–5].

Метою даної роботи був пошук штаму — продуцента треоніну серед різних видів мікроорганізмів та визначення умов підвищення його біосинтезу.

### Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були мікроорганізми *Candida utilis* ЛК-5, *Aspergillus awamori* Н-4, *Pichia anomala* К-1, *Micrococcus brevis* М-3, *Basillus cereus* Д-3, *Bacillus subtilis* С-3, *Brevibacterium flavum* ТН-7 з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України.

Бактеріальні культури зберігали на м'ясопептонному агарі (м'ясопептонний бульйон з 2% агару), дріжджові культури і гриби — на солодовому агарі (солодове сусло з 2% агару).

Культивування бактерій проводили на збагаченому м'ясопептонному агарі (склад: м'ясопептонний бульйон — 0,1 дм<sup>3</sup>, глюкоза — 0,1 г, дріжджовий екстракт — 0,5 г, агар — 2%) за температури 32 °С протягом доби, після чого переносили клітини із розрахунку  $1 \cdot 10^3$  КУО/дм<sup>3</sup> середовища в стерильні колби об'ємом 0,1 дм<sup>3</sup> з 0,03 дм<sup>3</sup> рідкого середовища (г/дм<sup>3</sup>): пептон — 5,0, NaCl — 3,0, глюкоза — 40, дріжджовий екстракт — 0,5.

Дріжджі та гриби культивували на солодовому агарі (солодове сусло: 8% сухих речовин з 2% агару) за температури 30 °С протягом доби, після чого переносили клітини із розрахунку  $1 \cdot 10^3$  КУО/дм<sup>3</sup> середовища в стерильні колби об'ємом 0,1 дм<sup>3</sup> з 0,03 дм<sup>3</sup> рідкого середовища (г/дм<sup>3</sup>): глюкоза — 40,0; КН<sub>2</sub>Р<sub>0</sub><sub>4</sub> — 2,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 5,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>НР<sub>0</sub><sub>4</sub> — 0,2; MgSO<sub>4</sub> — 0,5.

Вміст різних компонентів середовища змінювали залежно від поставленого завдання. Джерела вуглецю — глюкозу, фруктозу, сахарозу — вносили в середовище з розрахунку 40 г/дм<sup>3</sup>. Концентрація Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> варіювала від 0,1 до 0,5 г/дм<sup>3</sup>; проліну — від 0,4 до 2,0 г/дм<sup>3</sup>; тіаміну НСl  $1-5 \cdot 10^{-3}$  г/дм<sup>3</sup>; біотину  $1-5 \cdot 10^{-4}$  г/дм<sup>3</sup>; дріжджового

екстракту 0,5–2,5 г/дм<sup>3</sup>; ізолеїцину та метіоніну — від 0,1 до 0,5 г/дм<sup>3</sup>.

Культивування мікроорганізмів проводили в шейкері — інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) з 240 об/хв упродовж чотирьох діб.

Інтенсивність росту визначали після чотиридобової ферментації за допомогою фотокolorиметра моделі КФК-3 із зеленим світлофільтром (центральна довжина хвилі 533 нм) в кюветах об'ємом 0,01 дм<sup>3</sup> з вихідним середовищем як стандартом для порівняння. Визначення кількості мікроорганізмів в 0,01 дм<sup>3</sup> середовища здійснювали за градуваною кривою, яку було побудовано на основі визначення одиниць оптичної густини бактеріальних суспензій, приготовлених на живильному середовищі.

Кількість кисню визначали за допомогою промислового аналізатора кисню АРК-ІІІ (Росія).

Рівень синтезу амінокислот встановили, порівнявши кількісний склад амінокислот мікроорганізмів, що був отриманий за допомогою амінокислотного аналізатора ААА 400 (Чехія). Статистичну обробку даних виконали за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліді проводили в трьох повторах. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при  $P < 0,05$ . Як контроль використовували стерильне середовище.

## Результати та обговорення

Проведено скринінг за ознакою «якісний склад амінокислот» культур мікроорганізмів з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України (табл. 1).

Виявлено, що всі досліджувані мікроорганізми гетерогенні за цією ознакою. Найбільшу кількість треоніну синтезував *B. flavum* ТН-7. Подальші дослідження проводили із цією культурою.

Для продуктивного культивування мікроорганізмів має значення склад середовища та технологічні умови, які забезпечували б високу продуктивність накопичення біомаси і вміст необхідних метаболітів, у даному разі треоніну.

Джерелом енергії, необхідним для життєдіяльності мікроорганізмів, можуть бути різні вуглецевмісні сполуки, головними з яких є вуглеводи.

Досліджено вплив вуглеводів глюкози, фруктози та сахарози на синтез треоніну та біомаси (табл. 2).

Таблиця 1. Синтез амінокислот різними мікроорганізмами

Продукт	<i>Candida utilis</i> Л-3	<i>Candida utilis</i> ЛК-5	<i>Aspergillus awamori</i> Н-4	<i>Pichia anomala</i> К-1	<i>Micrococcus brevis</i> М-3	<i>Bacillus cereus</i> Д-3	<i>Bacillus subtilis</i> С-3	<i>Brevibacterium flavum</i> ТН-7
Амінокислоти								
Ala	–	+	+	–	–	–	–	+
Arg	+	+	+	+	+	+	–	+
Asp	+	–	+	+	+	+	+	+
Pro	–	–	++	–	++	–	–	–
Met	–	+	–	–	+	–	–	+
Gly	+	–	+	+	–	+	+	+
Glu	+	+	+	–	+	+	–	+
Ile	–	+	+	+	+	+	+	+
Lys	–	–	+	–	–	–	–	+
Ser	–	+	+	–	+	–	–	+
Thr	++	+	+	+	+	+	+	+++
Tyr	–	–	–	–	–	+	+	+
Trp	+	+++	+	++	+	–	++	+

Примітка: – не продукує; +, ++, +++ відносний ступінь продукування.

Таблиця 2. Вплив джерела вуглецю на синтез біомаси та треоніну

Джерело вуглецю	Біомаса, г/дм <sup>3</sup>	Концентрація треоніну, г/дм <sup>3</sup>
Глюкоза	22,3 ± 0,5	2,40 ± 0,04
Сахароза	25,8 ± 0,5	2,60 ± 0,04
Фруктоза	20,8 ± 0,4	1,80 ± 0,04

У процесі вирощування культури на різних вуглеводах було встановлено (табл. 2), що найкращим джерелом для синтезу треоніну є середовище із сахарозою. На ньому виявлено найбільшу кількість біомаси — 25,8 г/дм<sup>3</sup> і синтезованого треоніну — 2,6 г/дм<sup>3</sup>, на глюкозі — 22,3 г/дм<sup>3</sup> та 2,4 г/дм<sup>3</sup> відповідно, на фруктозі — 20,8 г/дм<sup>3</sup> і 1,8 г/дм<sup>3</sup>. У подальших дослідженнях як джерело вуглецю використовували сахарозу.

У попередній роботі [6] було показано, що за оптимальних умов культивування швидкість накопичення біомаси та утворення продуктів життєдіяльності залежить від кількості посівного матеріалу.

Вивчено вплив кількості посівного матеріалу на швидкість росту бактеріальної популяції та на біосинтез треоніну (рис. 1).

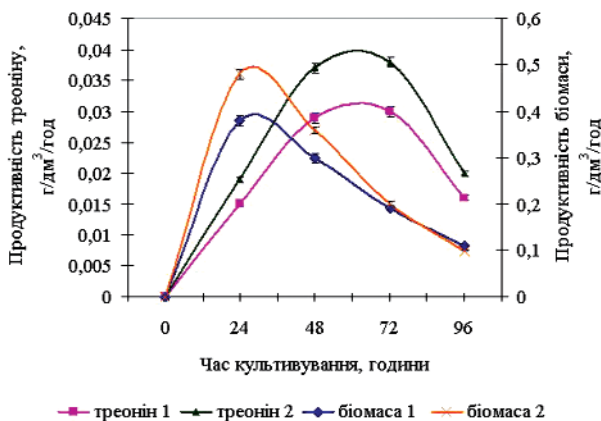


Рис. 1. Відносна швидкість синтезу біомаси та треоніну *Brevibacterium flavum* ТН-7 за різної кількості посівного матеріалу: 1 — 10%, 2 — 20%

Відносна швидкість росту бактерій збільшувалася з підвищенням кількості посівного матеріалу. Найбільше значення швидкості синтезу (0,48 г/дм<sup>3</sup>/год) відзначено через 24 год після внесення 20% посівного матеріалу. У разі внесення посівного матеріалу в об'ємі 10% значення відносної швидкості росту було незначним і становило 0,38 г/дм<sup>3</sup>/год. Висока відносна швидкість біосинтезу треоніну спостерігалась із внесенням 20% посівного матеріалу, однак

у зв'язку з тим, що процес біосинтезу починався пізніше, ніж активне утворення біомаси, максимум зафіксовано в інтервалі від 48 до 72 год культивування. Зі внесенням 10% посівного матеріалу відносна швидкість синтезу треоніну була невисокою, що можна пояснити незначним накопиченням біомаси.

У попередній роботі [7] було показано, що підвищення концентрації посівного матеріалу до 30% пригнічує швидкість росту біомаси та синтезу вихідного продукту. Встановлено, що оптимальна концентрація посівного матеріалу становила 20% від об'єму ензиматичного середовища.

Одним із чинників, що впливає на ріст мікроорганізмів та їхню фізіологічну активність, є температура культивування мікроорганізмів. Досліджено процес накопичення біомаси та синтезу треоніну штамом *B. flavum* ТН-7 залежно від температури культивування (рис. 2).

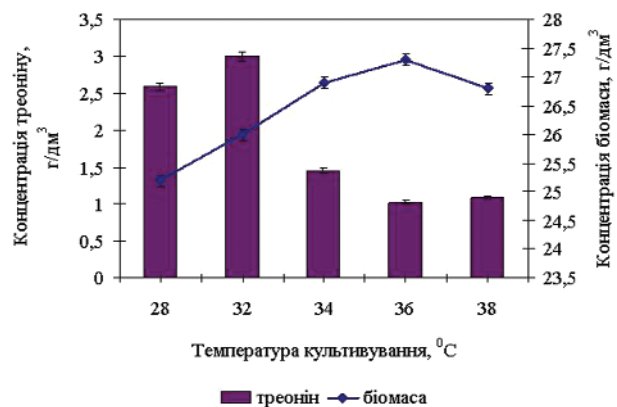


Рис. 2. Вплив температури культивування на синтез біомаси та треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7

Показано, що підвищення температури з 28 до 36 °C призвело до підвищення накопичення біомаси. Подальше підвищення температури до 38 °C зменшувало вміст біомаси. Синтез треоніну підвищувався до 3 г/дм<sup>3</sup> зі зміною температури з 28 до 32 °C, з подальшим підвищенням температури синтез падав до 1,46 г/дм<sup>3</sup>. Отже, для підвищення синтезу треоніну штам *B. flavum* ТН-7 потрібно культивувати при 32 °C. Наступні дослідження проводили саме за такої температури.

Суттєвий вплив на накопичення біомаси та синтез треоніну має рН середовища. У роботі [8] показано, що для стабілізації рН під час синтезу треоніну найкращим буферним агентом був Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Досліджено вплив

різних концентрацій  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на величину рН, на приріст біомаси та синтез треоніну штамом *B. flavum* ТН-7 (рис. 3).

Встановлено, що максимальне накопичення біомаси відбувалося за концентрації  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  —  $0,3 \text{ г/дм}^3$  і відповідному рН —  $5,0$ . При цьому максимальна кількість синтезованого треоніну була  $3,5 \text{ г/дм}^3$ . Показано, що коливання рН від  $4,8$  до  $5,2$  несуттєво впливали на накопичення біомаси та синтез треоніну. Далі дослідження проводили при рН  $5,0$ .

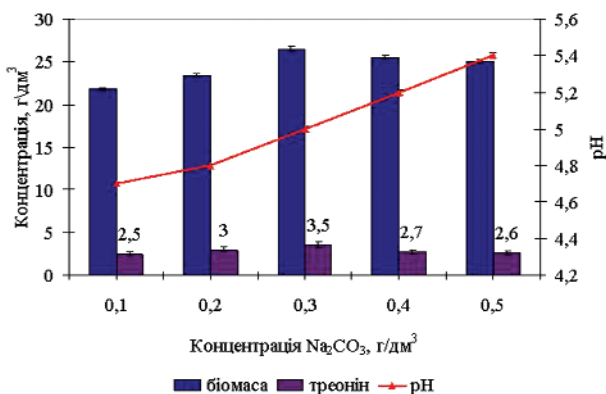


Рис. 3. Вплив  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на величину рН, на синтез біомаси та треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7

У процесі утворення треоніну бактеріальними клітинами суттєву роль відіграє кількість розчиненого в середовищі кисню. Було вивчено накопичення треоніну бактеріями *B. flavum* ТН-7 з урахуванням швидкості розчинення кисню. Динаміку утворення біомаси та треоніну залежно від зміни кількості розчиненого кисню подано на рис. 4.

Виявлено, що максимальне накопичення біомаси і треоніну відбувалося за різної швидкості розчинення кисню в середовищі.

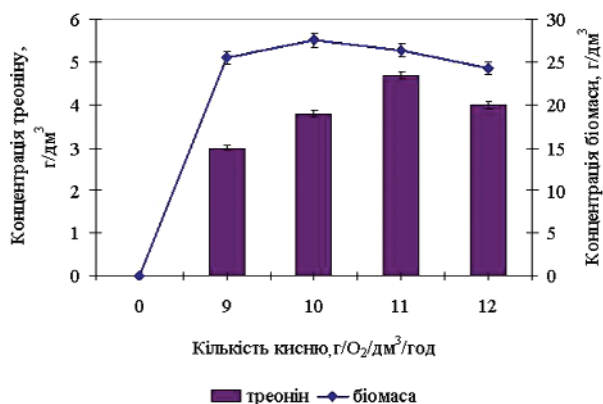


Рис. 4. Вплив розчиненого кисню на синтез біомаси та треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7

Для оптимального накопичення біомаси ця швидкість становила  $10 \text{ г/О}_2/\text{дм}^3/\text{год}$ , а для отримання максимальної кількості треоніну —  $11 \text{ г/О}_2/\text{дм}^3/\text{год}$ . Подальше збільшення швидкості розчинення кисню призводило до пригнічення росту біомаси та треоніну. У наступних дослідженнях використовували швидкість розчинення кисню  $11 \text{ г/О}_2/\text{дм}^3/\text{год}$ .

За результатами досліджень (табл. 1) встановлено, що штам *B. flavum* ТН-7 не синтезує пролін. Для оптимізації процесу культивування культури з'ясували залежність концентрації треоніну від кількості внесених у середовище проліну та суміші рістрегулювальних речовин — тіаміну, біотину, дріжджового екстракту (табл. 3).

У результаті проведених досліджень встановлено, що зі зміною концентрацій у суміші проліну, тіаміну, біотину, дріжджового екстракту концентрація треоніну в середовищі змінювалась від  $4,7$  до  $6,5 \text{ г/дм}^3$ . Для синтезу треоніну визначено оптимальну концентрацію ростових факторів у суміші ( $\text{г/дм}^3$ ): проліну —  $0,8$ ; тіаміну —  $0,002$ ; біотину —  $2,0 \cdot 10^{-4}$ ; дріжджового екстракту —  $1,0$ . За цих умов у культуральній рідині накопичувалось  $6,5 \text{ г/дм}^3$  треоніну.

Було з'ясовано [9], що мікроорганізми, які в процесі синтезу накопичували в культуральній рідині цільову амінокислоту, могли збільшувати швидкість синтезу у разі використання її попередника (цільової амінокислоти). У роботі [10] показано, що синтез треоніну відбувався із гомосерину як попередника.

Нами досліджено вплив різної концентрації гомосерину на синтез треоніну. Результати дослідження наведено на рис. 5.

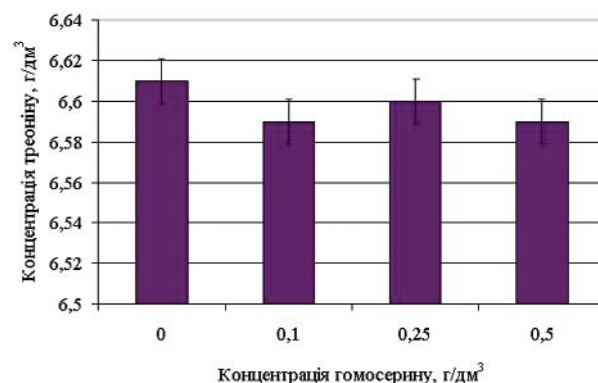


Рис. 5. Вплив концентрації гомосерину на синтез треоніну штамом *Brevibacterium flavum* ТН-7

Таблиця 3. Вплив ростових факторів на синтез треоніну

№ суміші	Концентрація у суміші внесених речовин, г/дм <sup>3</sup>				Концентрація треоніну в середовищі, г/дм <sup>3</sup>
	Пролін	Тіамін HCl, 1·10 <sup>-3</sup>	Біотин, 1·10 <sup>-6</sup>	Дріжджовий екстракт	
1	0,4	1,0	100	0,5	4,70±0,09
2	0,8	2,0	200	1,0	6,50±0,13
3	1,2	3,0	300	1,5	6,30±0,12
4	1,6	4,0	400	2,0	6,20±0,10
5	2,0	5,0	500	2,5	6,00±0,09

З рис. 5 видно, що внесення гомосерину різної концентрації в культуральну рідину з *B. flavum* TH-7 практично не призводить до підвищення швидкості синтезу треоніну навіть зі збільшенням концентрації гомосерину.

Треонін має розгалужений шлях біосинтезу. Ензими, що каталізують розгалуження шляху біосинтезу треоніну, пригнічувались тільки тоді, коли в середовищі присутні всі «кінцеві» амінокислоти. Якщо додавали «кінцеві» амінокислоти окремо, то це практично не впливало на біосинтез [10].

Нами проведено дослідження впливу суміші різної концентрації метіоніну та ізолейцину на синтез треоніну (табл. 4).

З результатів, наведених в табл. 4, випливає, що внесення додатково «кінцевих» амінокислот метіоніну та ізолейцину різної концентрації в культуральне середовище впливало на процес біосинтезу треоніну. Було підібрано оптимальну концентрацію суміші ізолейцину та метіоніну (зі вмістом

Таблиця 4. Синтез треоніну на середовищі з різним вмістом амінокислот

№ суміші	Концентрація, г/дм <sup>3</sup>		Біомаса, г/дм <sup>3</sup>	Концентрація треоніну в середовищі, г/дм <sup>3</sup>
	ізолейцину	метіоніну		
1	0,1	0,1	25,3±0,5	6,5±0,3
2	0,2	0,2	25,8±0,5	6,7±0,1
3	0,3	0,3	26,1±0,5	7,0±0,1
4	0,4	0,4	28,3±0,6	7,3±0,2
5	0,5	0,5	35,8±0,6	6,3±0,1

0,4 г/дм<sup>3</sup> кожної амінокислоти), додавання якої підвищило кількість треоніну в культуральній рідині до 7,3 г/дм<sup>3</sup>.

Таким чином, синтез треоніну можна збільшити, змінюючи умови культивування. У результаті підібраних умов культивування та середовища синтез треоніну підвищився майже в 3 рази (з 2,4 г/дм<sup>3</sup> до 7,3 г/дм<sup>3</sup>).

## ЛІТЕРАТУРА

1. *Debabov V. G.* The threonine story // *Biochem. Engineer./Biotechnol.* — 2003. — V. 79. — P. 113–136.
2. *Delaunay S., Uy D., Baucher M. F. et al.* ImPortance of PhosPhoenolPyruvate carboxylase of *Corynebacterium glutamicum* during the temPerature triggered glutamic acid fermentation // *Metab. Eng.* — 1999. — V. 1 — P. 334–343.
3. *Hermann T.* Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria // *J. Biotechnol.* — 2003. — V. 104 — P. 155–172.
4. *Lee M.-H., Lee H.-W.* Improved L-threonine Production of *Escherichia coli* Mutant by Optimization of Culture Conditions // *J. Biosc. Bioeng.* — 2006. — V. 101 — P. 127–130.
5. *Підгорський В. С., Іутинська Г. О., Пирог Т. П.* Інтенсифікація технологій мікробного синтезу. — К.: Наук. думка, 2010 — 328 с.
6. *Shulga S. M., Tkachenko A. F., Beyko N. E.* Biosynthesis of lipids by the the yeast *Rhodotorula gracilis* // *Microorganisms in Industry and Environment from Scientific an Industrial Research to Consumer Products. Proceeding of the III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2009).* — 2011. — P. 298–302.
7. *Шульга С. М., Ткаченко А. Ф., Бейко Н. Е. и др.* Биосинтез липидов дрожжами *Rhodotorula gracilis* // *Біотехнологія.* — 2010. — Т. 3, № 3. — С. 58–65.
8. *Young T. K., Ghispy J. R.* Microbial Production of Lysine and Threonine from Whey Permeate // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 45, N 2. — P. 610–615.
9. *Шульга С. М., Ткаченко А. Ф., Тигунова Е. А. и др.* Влияние компонентов энзиматической среды на биосинтез триптофана // *Біотехнологія.* — 2011. — Т. 4, № 3. — С. 51–55.
10. *Пирог Т. П., Ігнатова О. А.* Загальна біотехнологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2009. — 336 с.

**ИНТЕНСИФИКАЦИЯ БИОСИНТЕЗА  
ТРЕОНИНА ШТАММОМ  
*Brevibacterium flavum* TH-7**

*С. М. Шульга  
О. А. Тигунова  
А. Ф. Ткаченко  
Н. Е. Бейко  
Г. С. Андрияш  
С. Г. Приемов*

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

*E-mail: Shulga5@i.ua*

Научные разработки в области биотехнологии незаменимых аминокислот направлены как на селекцию более продуктивных штаммов микроорганизмов, так и на создание оптимальных условий культивирования продуцентов и подбор экономически целесообразного сырья для этих технологий. Проведен поиск штамма-продуцента треонина среди бактериальных культур из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины. Отобран продуцент треонина *Brevibacterium flavum* TH-7, накапливающий наибольшее количество этой аминокислоты в культуральной жидкости. Максимальная активность синтеза наблюдалась на сахарозосодержащей среде. Определен процент (20%) посевного материала, необходимый для полноценного синтеза треонина. Установлено, что добавление гомосерина не стимулирует синтез треонина. Подобраны оптимальные условия культивирования, а также стимуляторы, интенсифицирующие биосинтез.

**Ключевые слова:** треонин, *Brevibacterium flavum* TH-7, биосинтез, аминокислоты.

**THREONINE BIOSYNTHETIC  
INTENSIFICATION BY  
*Brevibacterium flavum* TH-7 STRAIN**

*S. M. Shulga  
O. O. Tigunova  
A. F. Tkachenko  
N. E. Beyko  
G. S. Andriash  
S. G. Priemov*

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

*E-mail: Shulga5@i.ua*

Scientific developments in the area of biotechnology of essential amino acids were directed both on the selection of more productive cultures of microorganisms and on creation of optimum cultivation of the producers and selection of economic expedient raw materials for these technologies.

Search of threonine bacterial cultures from «Collection microorganism's stains and Plants line for food and agriculture biotechnology» of the Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine was carried out. It was made a choice of threonine producer stain *Brevibacterium flavum* TH-7, which synthesized the most quantity of this amino acid. Influence of some carbon source on threonine biosynthesis was observed. The most activity of threonine biosynthesis was shown on sucrose containing medium. The sowing material percent (20%) that were necessary for optimal threonine synthesis were defined. It was determined that adding homoserine to medium had no effect on threonine biosynthesis. It was chosen the optimal culture conditions, as well as stimulants that intensify biosynthesis.

**Key words:** threonine, *Brevibacterium flavum* TH-7, biosynthesis, amino acids.