

Биология

УДК 577.112.3

Փ. Ն. ԿՐՈՒՆԻ, Ա. Օ. ԿՈԼՈՅԱՆ, Շ. Ր. ԲԱԼԱԲԵԿՅԱՆ, Թ. Վ. ԽԱՇԱԿՅԱՆ,  
Թ. Ա. ՏԱԽԲԱԶՅԱՆ, Ա. Տ. ՕՎՏԵՍՅԱՆ

ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ НА БИОСИНТЕЗ  
АМИНОКИСЛОТ КОРИНЕФОРМНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Изучено влияние органических кислот на рост и биосинтез аминокислот некоторыми штаммами-продуцентами коринеформных бактерий. Показано, что органические кислоты (молочная, уксусная, лимонная) в синтетической питательной среде в концентрациях 0,5–1% усваиваются штаммами-продуцентами L-пролина, L-орнитина, L-серина и L-аргинина. Наличие в питательной среде этих органических кислот по-разному отражается на биосинтезе аминокислот.

**Введение.** Постоянно растущие потребности микробиологической промышленности в углеродсодержащем сырье диктуют необходимость поиска новых источников сырья. В микробиологическом синтезе источником углерода, кроме традиционных углеводов (сахароза, глюкоза), могут служить и органические кислоты. В то же время существует возможность регуляции метаболической активности микроорганизмов путем изменения углеродного питания. Известно, что органические кислоты, особенно кетокислоты, недоступны для большинства микроорганизмов. Однако, по мнению некоторых исследователей, органические кислоты могут успешно ими усваиваться [1, 2]. В настоящее время уксусная кислота применяется в качестве основного или дополнительного источника углерода при биосинтезе L-лизина, L-глутаминовой кислоты, L-треонина, L-изолейцина.

Целью настоящей работы являлось проведение исследований по изучению влияния органических кислот в составе синтетических питательных сред на рост и биосинтез некоторых аминокислот штаммами-продуцентами.

**Материалы и методы.** В работе использовались следующие штаммы-продуценты микроорганизмов: *Brevibacterium flavum* AP-111 (iso<sup>-</sup>) – продуцент L-пролина [3], *Brevibacterium flavum* C-2 (прототроф) – продуцент L-серина [4], *Corynebacterium glutamicum* ГА-8 (arg<sup>-</sup>, cit<sup>-</sup>) – продуцент L-орни-

тина [5], *Brevibacterium flavum* НК-19А (ile<sup>-</sup>, D-ser<sup>S</sup>, ArgHx<sup>r</sup>, TA<sup>r</sup>) – продуцент L-аргинина [6].

Культивирование проводили в колбах Эрленмейера емкостью 500 мл с объемом среды 15 мл на круговой качалке (200–220 об/мин, что соответствует скорости растворения кислорода 2,2 г на л·ч) в течение 72 ч при температуре 30<sup>0</sup>С. Выращивание посевного материала проводили в тех же условиях в течение 16 ч.

Процесс накопления биомассы и биосинтеза осуществляли в синтетической питательной среде, содержащей в качестве основного источника углерода различные концентрации сахарозы, источника азота (неорганические соли), а также витамины и ростовые факторы. В ферментационные среды вносились уксусная, лимонная или молочная кислоты в концентрациях 0,1–1,5%. В качестве посевного материала использовали суспензию клеток, полученных смывом культуры с поверхности скошенного агара. Количество вносимого посевного материала составляло 10% объема ферментационной среды в колбах. Количество биомассы определяли по оптической плотности с последующим пересчетом на сухой вес на фотоэлектроколориметре КФК-2 (540 нм).

Содержание аминокислот определяли методами бумажной хроматографии в системе бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1) и тонкослойной хроматографии на пластинках «Силуфол» в системе изопропанол–ацетон–аммиак–вода (50:50:12:8). Содержание аргинина в культуральной жидкости определяли колориметрически по модифицированному методу Сакагучи. Контролем служила синтетическая среда без добавления органических кислот. Полученные результаты обрабатывали статистически с учетом критерия Стьюдента.

**Результаты и обсуждение.** Эксперименты по использованию органических кислот для выращивания посевного материала проводились в 2-х вариантах: в первом (I) исследовалось влияние органических кислот на рост штаммов-продуцентов на фоне основного источника углерода сахарозы (3%), во втором (II) – органические кислоты использовались в средах в качестве единственного источника углерода (табл. 1).

Как видно из приведенных данных, добавление органических кислот в различных концентрациях (0,1–1,5%) в посевную питательную среду наряду с сахарозой (вариант I) не оказывает существенного влияния на уровень накопления биомассы относительно контрольной среды, где эти кислоты отсутствовали.

Результаты, полученные при полной замене в посевных средах сахарозы на органические кислоты (молочную, уксусную, лимонную) (вариант II), показали, что с увеличением концентрации кислот до 1% в среде наблюдается рост биомассы штаммов-продуцентов. Это свидетельствует об их усваивании исследуемыми штаммами-продуцентами аминокислот. Однако содержание более 1% органических кислот в питательной среде ингибировало рост биомассы исследуемых штаммов-продуцентов.

При выращивании штамма-продуцента L-пролина наиболее высокий выход биомассы был отмечен на посевной питательной среде с содержанием

молочной кислоты. Такая же закономерность наблюдалась при выращивании штамма-продуцента L-серина, в то время как наличие лимонной и уксусной кислот в указанных концентрациях приводило к существенному снижению накопления биомассы. Необходимо отметить, что общий уровень образования биомассы штаммов-продуцентов при вышеуказанных исследуемых вариантах ниже, чем на среде с сахарозой. Полученные данные подтверждают предположение, что в процессе роста помимо традиционных источников углерода (сахароза, глюкоза) коринеформные бактерии способны усваивать также ряд органических кислот ЦТК, что согласуется с мнением некоторых авторов [6]. Как показали исследования, посевной материал, выращенный на средах с органическими кислотами, не уступал по биосинтетической активности посевному материалу, выращенному на среде с сахарозой.

Таблица 1

Влияние органических кислот на рост штаммов-продуцентов исследуемых аминокислот

Концентрация органических кислот в среде, %	Количество биомассы, г/л					
	молочная к-та		лимонная к-та		уксусная к-та	
	I	II	I	II	I	II
<i>Br. flavum AP-111</i>						
контроль	5,0±0,3	4,6±0,3	5,0±0,5	4,6±0,2	5,0±0,5	4,7±0,1
0,1	6,0±0,5	5,0±0,4	4,8±0,3	4,6±0,1	4,6±0,4	4,4±0,1
0,5	5,4±0,1	5,1±0,1	5,0±0,5	4,8±0,4	5,0±0,3	4,0±0,2
1,0	5,5±0,5	5,1±0,5	5,0±0,5	4,7±0,3	4,5±0,1	4,0±0,3
1,5	5,4±0,5	3,2±0,1	5,0±0,1	3,2±0,5	4,5±0,1	3,8±0,2
<i>C. glutamicum ГА-8</i>						
контроль	5,7±0,1	3,6±0,4	5,8±0,2	3,4±0,1	5,7±0,2	3,4±0,5
0,1	5,5±0,2	4,0±0,2	5,9±0,1	3,4±0,1	6,9±0,1	4,1±0,3
0,5	5,7±0,1	3,9±0,3	5,6±0,2	3,7±0,1	7,0±0,1	4,1±0,3
1,0	5,6±0,1	3,8±0,4	5,6±0,2	3,7±0,2	7,0±0,1	4,1±0,4
1,5	4,7±0,3	3,5±0,1	5,5±0,5	3,7±0,3	5,6±0,5	4,1±0,1
<i>Br. flavum C-2</i>						
контроль	4,4±0,4	4,6±0,2	4,7±0,2	2,9±0,3	4,3±0,2	2,9±0,1
0,1	4,9±0,3	4,6±0,2	5,1±0,2	2,9±0,3	4,3±0,7	2,9±0,1
0,5	5,9±0,3	4,3±0,3	4,8±0,4	2,0±0,5	4,5±0,3	2,7±0,2
1,0	5,1±0,2	3,5±0,4	4,7±0,3	1,6±0,5	4,7±0,2	2,7±0,1
1,5	5,4±0,2	2,4±0,4	4,9±0,1	1,4±0,5	4,9±0,1	2,1±0,3
<i>Br. flavum НК-19А</i>						
контроль	5,2±0,2	4,2±0,1	5,3±0,1	4,0±0,3	5,3±0,2	4,1±0,2
0,1	5,0±0,2	4,8±0,4	5,4±0,1	4,0±0,3	6,0±0,4	4,3±0,2
0,5	5,2±0,1	4,8±0,5	5,2±0,1	4,2±0,5	6,1±0,5	4,3±0,1
1,0	5,1±0,1	4,5±0,3	5,3±0,1	4,2±0,1	6,1±0,5	4,2±0,3
1,5	5,0±0,1	4,0±0,3	5,6±0,2	4,2±0,1	5,2±0,3	4,3±0,2

В табл. 2 представлены данные по влиянию органических кислот на биосинтез аминокислот исследуемыми штаммами-продуцентами коринеформных бактерий. В ферментационную среду, где основным источником углерода являлась сахароза, органические кислоты вносились в концентрации 0,5% с предварительно подведенным значением pH=7,0.

Как видно из приведенных данных, добавление 0,5% молочной или лимонной кислот в ферментационную среду сильно подавляло биосинтез L-серина, в то время как добавление уксусной кислоты в такой же концентрации почти не влияло на уровень накопления L-серина в культуральной жидкости.

Присутствие молочной кислоты в ферментационной среде при биосинтезе L-пролина штаммом-продуцентом *Br. flavum AP-111* существенно увеличивало его выход, в то же время добавление остальных органических кислот оказывало незначительное влияние. Ранее нами был показан эффект изменения количества выхода L-пролина при добавлении молочной кислоты в различных концентрациях в ферментационную среду и для других ауксотрофных по L-изолейцину мутантов штаммов-продуцентов [3].

Как известно, предшественником биосинтеза пролина является глутаминовая кислота, которая синтезируется непосредственно из  $\alpha$ -кетоглутарата. В свою очередь  $\alpha$ -кетоглутарат синтезируется из ацетил-КоА и оксалоацетата. Оксалоацетат играет ключевую роль в путях биосинтеза пролина, так как он может синтезироваться из глюкозы, а также молочной и уксусной кислот. Существуют три возможных пути синтеза пролина из глюкозы: два – из молочной кислоты и один – из уксусной кислоты. Предыдущие исследования показали, что глюкоза является более предпочтительным источником углерода, чем молочная и уксусная кислоты для синтеза пролина у *Br. flavum*. Это выражается в более высоких коэффициентах продуктивности, в меньших затратах как энергии в форме АТФ, так и кислорода, в более низком тепловыделении. Но при использовании молочной или уксусной кислот в качестве источников углерода и энергии для синтеза пролина наблюдаются большая максимальная скорость накопления и большая конечная концентрация пролина, естественно при больших затратах молочной или уксусной кислот [7].

Таблица 2

Влияние органических кислот на биосинтез аминокислот различными штаммами-продуцентами коринеформных бактерий

Варианты питательных сред	Количество L-аминокислот *, %							
	<i>Br. flavum AP-111</i>		<i>Br. flavum C-2</i>		<i>C. glutamicum ГА-8</i>		<i>Br. flavum НК-19А</i>	
	пролин	глут. к-та	серин	глут. к-та	орнитин	глут. к-та	аргинин	глут. к-та
Контроль	100	100	100	100	100	100	100	100
Контроль + молочная к-та	145	35,2	34,6	140	90,6	125	91,2	124
Контроль + лимонная к-та	104	44,1	74,5	105	101,1	95	99,8	94
Контроль + уксусная к-та	95,7	67,3	95,4	98,8	115,1	77	109,5	83

\* – уровень выхода аминокислот рассчитывали относительно контроля.

Как видно из табл. 2, добавление уксусной кислоты в ферментационную среду стимулировало биосинтез L-орнитина и L-аргинина у исследуемых штаммов-продуцентов, в то время как наличие молочной и лимонной кислот приводило к незначительному ингибированию их биосинтеза. Как известно, пути биосинтеза орнитина и аргинина начинаются с глутаминовой кислоты и проходят пять общих этапов, причем орнитин является промежуточным соединением на пути биосинтеза аргинина. В случае биосинтеза этих аминокислот, возможно, энергетически выгоднее использовать уксусную кислоту, чем молочную или лимонную.

Показано, что путем регуляции углеродного питания можно изменить состав метаболитов в культуральной жидкости [2]. Были проведены исследования по влиянию органических кислот в составе ферментационной среды на синтез сопутствующих аминокислот при биосинтезе L-пролина, L-орнитина, L-серина, L-аргинина. В табл. 2 показано изменение содержания L-глутаминовой кислоты в составе культуральной жидкости при добавлении в состав ферментационной среды 0,5% исследуемых органических кислот. Как видно из приведенных данных, наибольшее увеличение содержания L-глутаминовой кислоты наблюдалось у штамма-продуцента L-серина *Br. flavum C-2* при использовании молочной кислоты в концентрации 0,5% (на 40% относительно контроля). Уменьшение количества этой сопутствующей аминокислоты наблюдалось у штамма-продуцента L-пролина в ферментационной среде, содержащей молочную кислоту, а у продуцентов L-аргинина и L-орнитина – уксусную кислоту.

Полученные данные свидетельствуют о том, что органические кислоты могут влиять как на выход конечного продукта, так и на количество сопутствующих аминокислот.

Таким образом, для биосинтеза некоторых аминокислот – L-пролина, L-серина, L-орнитина и L-аргинина – можно в состав синтетической ферментационной среды добавлять органические кислоты в концентрации 0,5%. Их использование в процессе биосинтеза аминокислот ведет к изменению количественного состава сопутствующих аминокислот. Возможно, что это влияние осуществляется изменением внутриклеточного пула АТФ, играющего важную роль в метаболизме аминокислот коринеформных бактерий.

ЗАО «НИИ Биотехнология» МЭ РА,  
кафедра микробиологии, биотехнологии  
растений и микроорганизмов ЕГУ

Поступила 06.05.2009

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Роуз Э. Химическая микробиология. М.: Мир, 1971, с. 294.
2. Шапошников В.Н. Основные физико-химические закономерности физиологии обмена веществ микроорганизмов. М.: Наука, 1968, с. 329.
3. Тхруни Ф.Н., Карабеков Б.П. и др. А.с. СССР № 1139753 А2, 1983.

4. Տխրունի Ֆ.Ն., Խաչատրյան Տ.Վ., Չորաբյան Ա.Ս. ՀՀ արտոնագիր , № 412 A2 1997.
5. Բալաբեկյան Ծ.Ռ., Տխրունի Ֆ.Ն., Արաջանյան Ա.Ե. ՀՀ արտոնագիր , № 415 A2 1997.
6. Колоян А.О. Биолог. ж. Армении, 2006, № 1–2 (58), с. 29–33.
7. Амбарцумян А.А., Акопян Э.М., Карапетян Ж.В., Кочарян Ш.М. Биотехнология, 1986, № 5, с. 102–107.

Ֆ. Ն. ՏԽՐՈՒՆԻ, Հ. Օ. ԶՈՒՆՅԱՆ, Ծ. Ռ. ԲԱԼԱԲԵԿՅԱՆ, Տ. Վ. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ,  
Տ. Ա. ՇԱՀԲԱԶՅԱՆ, Ա. Ս. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ

ԿՈՐԻՆԵՖՈՐՄ ՍԱՆՐԷՆԵՐՈՎ ԱՄԻՆԱԹՈՒՆԵՐԻ  
ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՎՐԱ ՕՐԳԱՆԱԿԱՆ ԹՈՒՆԵՐԻ  
ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Ուսմնասիրվել է օրգանական թթուների ազդեցությունը որոշ կորինեֆորմ մանրէների աճի և ամինաթթուների կենսասինթեզի վրա: Յույց է տրված, որ սինթետիկ սննդարար միջավայրում 0,5–1,0% կոնցենտրացիաներով օրգանական թթուները (կաթնաթթու, քացախաթթու, կիտրոնաթթու) յուրացվում են շտամ-արտադրիչներ L-պրոլինի, L-օրնիթինի, L-սերինի, L-արգինինի կողմից: Սինթետիկ սննդարար միջավայրում նշված օրգանական թթուների առկայությունը տարբեր ձևով է ազդում ամինաթթուների կենսասինթեզի վրա:

F. N. TKHRUNI, A. O. KOLOYAN, Ts. R. BALABEKYAN, T. V. KHACHATRYAN,  
T. A. SHAHBAZYAN, A. S. HOVSEPYAN

INFLUENCE OF ORGANIC ACIDS ON THE BIOSYNTHESIS OF AMINO  
ACIDS BY CORYNEFORM BACTERIUM

Summary

The effect of organic acids on the growth of some coryneform bacteria and on the biosynthesis of amino acids have been studied. It was shown that the organic acids (lactic, acetic, citric) in the synthetic nutrient medium in the concentrations 0,5–1,0% were assimilated by the strain producers of L-proline, L-ornithine, L-serine and L-arginine. Their presence in the nutrient medium influences on the biosynthesis of amino acids differently.