

УДК 579.64

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИЗИНА НА ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ СРЕДАХ PRODUCTION OF LYSINE ON THE SEMI-SYNTHETIC MEDIUM

А.М. Жусупова, С.К. Барбасова, О.А. Тен

Филиал РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Степногорск
ipbncbrk@mail.ru

L-лизин является незаменимой аминокислотой, необходимой для питания животных и человека. В практике животноводства целесообразно применение чистого лизина промышленного производства. Перспективным является получение лизина путем микробиологического синтеза. Был проведен подбор питательной среды с оптимальными концентрациями составляющих компонентов, обеспечивающих максимальное накопление лизина при культивировании штамма-продуцента *Brevibacterium sp.* шт. 92. Оценка качества оптимизации проводили методами биохимического анализа культуральной жидкости: определение концентрации сухой биомассы фильтрационным методом, определения редуцирующих веществ - методом Бертрана. Определение массовой концентрации аминокислот проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Выбрана оптимальная среда ФЛ следующего состава, г/л: сахара - 100,0; KH_2PO_4 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,0; биотин - 1,3; тиамин - 3,3; дрожжевой автолизат - 10,0 мл/л, треонин - 6,6. Концентрация лизина в культуральной жидкости *Brevibacterium sp.* шт. 92 на среде ФЛ составила 98,7 мг/г. Финансирование работы осуществлено в рамках проекта «Разработка технологии производства кормовой добавки на основе использования лизина, треонина и метионина» по межгосударственной целевой программе Евразийского экономического сообщества «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 гг.

Ключевые слова: лизин, штамм-продуцент, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

L-лизин является незаменимой аминокислотой, необходимой для питания животных и человека. Он должен присутствовать в пищевых продуктах и в кормах, которые дополнены лизином. Корма для животных, которые, как правило, основаны на кукурузе, пшенице или ячмене, бедны лизином. Ценными, таким образом, являются добавки, содержащие в своем составе данную аминокислоту [1].

L-лизин входит в состав большинства белков. В животном белке его содержание выше, чем в растительном. В белке зерновых культур лизина очень мало (в ячмене -3,6%), в то время как в мышечных тканях, молоке, яйцах лизин составляет достаточно большую долю белка (в молоке – 7,7) [2]. В организме животного лизин оказывает влияние на минеральный обмен (способствует усвоению кальция, фосфора, железа), участвует в процессе превращения каротина в ретинол, влияет на кроветворную функцию костного мозга и на активность ферментов. Недостаток лизина в организме животного (наиболее дефицитен в рационах свиней и птицы) вызывает резкое падение привесов, ухудшение общего состояния животного на фоне падения иммунитета, проявляются признаки анемии и общего истощения (особенно у поросят). Добавка лизина в рационы до нормы позволяет устранить вышеуказанные симптомы. Не секрет, что в практике кормления дефицит аминокислот, в первую очередь лизина, устраняется путем добавления к зерну сои, шротов и жмыхов рапса, подсолнечника, а также мясокостной и рыбной муки. Однако обеспечить корма большинством из этих компонентов не удастся по различным причинам, в частности, из-за стоимости. В связи с этим является целесообразным применение чистого лизина промышленного производства [3].

Перспективным является получение лизина путем микробиологического синтеза. Целью работы является выбор полусинтетической среды с оптимальными концентрациями составляющих ее компонентов, обеспечивающих максимальное накопление лизина при культивировании штамма-продуцента.

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбран штамм-продуцент аминокислоты лизина - *Brevibacterium sp.* шт. 92 из коллекции филиала РГП «Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан» в г. Степногорск.

В процессе работы использованы питательные среды различного состава. Для приготовления

питательных сред пользовались приведенными ниже прописями.

Среда АМЛ-1, г/л: сульфат аммония - 3,0, сульфат магния семиводный - 0,5, мел - 30,0, кукурузный экстракт - 30,0, сульфат калия двузамещенного - 1,5, сахароза - 100, рН 6,8-7,0.

Посевная среда ПЛ, г/л: меласса - 4, экстракт кормовых дрожжей - 2, сульфат аммония - 0,5, мел - 0,8, L-лейцин - 0,5, рН 6,8-7,0.

Среда ФСЗ, г/л: сахароза - 10,0, ЭКД - 3,0, сульфат аммония - 0,3, фосфат калия однозамещенного - 0,15, сульфат магния - 0,05, мел - 3, рН 6,8-7,0.

Среда ФЛ, г/л: сахароза - 100,0; K_2HPO_4 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,0; биотин - 1,3; тиамин - 3,3; дрожжевой автолизат - 10,0 мл/л, треонин - 6,6, рН 6,8-7,0.

При проведении исследований использованы микробиологические, биохимические, химические и физико-химические методы анализа [4, 5]. Оценку качества оптимизации проводили методами биохимического анализа культуральной жидкости: определение концентрации сухой биомассы фильтрационным методом, определение редуцирующих веществ - методом Бертрана [6]. Обработка результатов проведена методами регрессионной статистики с помощью табличного процессора EXCEL из пакета Microsoft Office [7]. Определение массовой концентрации аминокислот проводили методом определения аминокислот методом ВЭЖХ с этапом предколоночной дериватизации Dabs-CL на приборе ВЭЖХ Perkin Elmer series 200 с обращенно-фазной колонкой Zorbax Extend C18 зернением 5 мкм. Регистрацию пиков вели на УФ-детекторе при длине волны 436 нм. Время разделения 20 минут, скорость потока 1 мл/мин (таблица 1) [8].

Таблица 1. Режим разделения

Скорость потока мл/мин	Время	% элюента	% пробы в подвижной фазе
1,00	02.00.	71	29
	07.00.	57	43
	15.00.	49	51
	02.00.	14	86
	02.00	0	100
	02.00	71	29

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все продуценты лизина являются биотинзависимыми микроорганизмами. Если снизить количество биотина до 1-2 мкг/л, биосинтез лизина замедляется, но одновременно усиливается образование глутаминовой кислоты. Источником биотина, витаминов и ряда аминокислот являются обычно кукурузный экстракт и свекловичная меласса.

В процессе работы был поставлен эксперимент по культивированию микроорганизма в колбах Эрленмейера на разных средах. В первом опыте провели культивирование на среде АМЛ-1. Во втором опыте клетки штамма *Brevibacterium sp.* 92, выращенные при 30°C в течение 1-2 суток на МПА, петлей засеяли в колбы объемом 750 мл со 100 мл посевной среды ПЛ. Колбы помещали на качалку при 240 об/мин, 30°C на 18 часов. Готовым посевным материалом в количестве 10% засеяли ферментационную среду ФСЗ.

Культивирование посевного материала проводили на термостатируемой качалке, температура культивирования - (28-30)°C, 230 об/мин, время культивирования 72 часа. Через 72 часа после начала ферментации определили массовую концентрацию лизина методом ВЭЖХ. Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2. Концентрация лизина в пробах через 72 часа

Наименование ферментационной среды	Концентрация лизина, г/л
АМЛ-2	13,3
ФСЗ	14,5

Наибольшую концентрацию лизина показала проба, полученная на ферментационной среде ФСЗ, ее концентрация составила 14,5 г/л.

Для увеличения выхода лизина, учитывая биохимические особенности биосинтеза штамма – продуцента лизина, подобрали питательную среду ФЛ, следующего состава, г/л: сахароза - 100,0; K_2HPO_4 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,0; биотин - 1,3; тиамин - 3,3; дрожжевой автолизат - 10,0 мл/л, треонин - 6,6. Использование данной среды обусловлено регуляцией биосинтеза по принципу обратной связи [9]. Для ауксотрофных продуцентов лизина важным параметром является начальная дозировка в среде ростовых

факторов (аминокислот, которые штамм не может синтезировать самостоятельно).

Провели культивирование посевного материала при температуре 32°C, скорости вращения 240 мин⁻¹, 72 часа. Массовая концентрация лизина составила 51,5 г/л.

Полученную культуральную жидкость использовали для получения препарата в виде концентрата и в сухой форме. Перед концентрированием культуральную жидкость штамма-продуцента лизина *Brevibacterium sp* шт. 92 отделяли от культуры клеток продуцента фильтрованием. Для предотвращения деградации лизина в процессе нагревания в культуральную жидкость добавляли бисульфит натрия и соляную кислоту до pH 4,5-5,0. Концентрирование проводили на вакуум-выпарной установке «Vuchi-175». Для получения сухого препарата концентрат сушили на лабораторной распылительной сушилке при 120°C на входе, на выходе температура 60°C. Массовая концентрация лизина в концентрате составила 98,7 мг/г, в порошке - 200 мг/г.

ВЫВОДЫ

В процессе работы проведен подбор питательной среды, обеспечивающей максимальное образование лизина в процессе микробиологического синтеза с использованием штамма-продуцента *Brevibacterium sp* шт. 92. Оптимальной является питательная среда ФЛ следующего состава, г/л: сахара - 100,0; КН₂РО₄ - 5,0; MgSO₄·7H₂O - 5,0; биотин - 1,3; тиамин - 3,3; дрожжевой автолизат - 10,0 мл/л, треонин - 6,6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wittmann C., Becker O. *The L-Lysine Story: From Metabolic Pathways to Industrial Production* // *Microbiol Monography*. - 2006. - №2. - P. 1-2.
2. Пономаренко Ю.А. *Питательные и антипитательные вещества в кормах: монография*. - Минск: Экоперспектива, 2007. - 960 с.
3. Singh M. *Medicinal Uses of L-Lysine: Past and Future* // *Int. J. Res. Pharm. Sci.* - 2011. - №2(4). - P. 637-642.
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. *Практикум по микробиологии: учебное пособие для студ. высш. учебных заведений*. - М.: Изд. центр «Академия», 2005. - С. 217-320.
5. Егоров Н.С. *Практикум по микробиологии: учебное пособие*. - М.: Изд. Моск. ун-та, 1976. - С. 307.
6. Сакович Г.С., Безматерных М.А. *Физиология и количественный учет микроорганизмов*. - Екатеринбург: ГОУ ВПО УСТУ-УПИ, 2005. - 40 с.
7. ГОСТ 24026-80. *Исследовательские испытания. Планирование эксперимента. Термины и определения*.
8. Schneider H.J. *Amino Acid Analysis Using DABS-CL// Chromatographia*. - 1989. - №1/2. - P. 28-42.
9. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. *Биотехнология / под ред. А.В. Катлинского*. - М.: Издательский центр «Академия», 2008. - 256 с.

ТҮЙІН

L-лизин жануар және адам тағамы үшін қажетті амин қышқылы болып саналады. Мал шаруашылық тәжірибесінде өнеркәсіптік өндірісінің таза лизинін пайдалану мақсатты. Линизді микробиологиялық синтез жолымен алған перспективті болып саналады. *Brevibacterium sp.* штамм-продуцентін 92 дана өсіру кезінде лизиннің ең көп мөлшерде жиналуын қамтамасыз ететін құрылатын компоненттердің оңтайлы концентрацияларымен құнарлы ортаның іріктемесі өткізілді. Оңтайландыру сапасын бағалау өсінді сұйықтығының биохимиялық талдау әдістерімен өткізді: Бертрана әдісімен редуцияланған заттарды анықтау фильтрация әдісімен құрғақ биомасса концентрациясын анықтау. Амин қышқылдардың массалық концентрациясын жоғары тиімді сұйықтық хроматография (ЖТХ) әдісімен анықтау. Келесі құрамдағы ФЛ оңтайлы орта таңдалды, г/л: сахара - 100,0; КН₂РО₄ - 5,0; MgSO₄·7H₂O - 5,0; биотин - 1,3; тиамин - 3,3; ашытқы автолизат - 10,0 мл/л, треонин - 6,6. ФЛ ортасында өсінді сұйықтығында *Brevibacterium sp.* 92 дана лизин концентрациясы 98,7 мг/г құрады. Жұмысты қаржыландыру 2012-2014 жж. арналған «Инновациялық биотехнология» Евразиялық экономикалық қоғамдастығының мемлекетаралық мақсатты бағдарлама бойынша «Лизин, треонин және метионин пайдалану негізінде азық қосындысын өндіру технологиясын жетілдіру» жоба шеңберінде жүзеге асырылды.

Кілтгі сөздер: лизин, штамм-продуцент, жоғары тиімді сұйықтық хроматография.

SUMMARY

L-Lysine is an essential amino acid necessary for human and animal nutrition. It is appropriate to apply pure lysine of the industrial production for animal husbandry. It is promising to obtain lysine by microbiological synthesis. The selection of nutrient media was conducted with the optimum concentrations of the components to

ensure maximum accumulation of lysine by cultivating the producing strain *Brevibacterium sp. pcs. 92*. The evaluation of the optimization quality was carried out with the help of the methods of biochemical analysis of the culture fluid: determination of the concentration of dry biomass by filtration method of determination of reducing substances by Bertrand method. Determination of the mass concentration of amino acids was performed by the method of high performance liquid chromatography (HPLC). The optimum medium FL of the following composition g/l has been selected: sucrose - 100,0; KH_2PO_4 - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 5,0, biotin - 1,3, thiamin - 3,3, yeast autolysate - 10,0 ml/l, threonine - 6,6. The concentration of lysine in the culture liquid of *Brevibacterium sp. pcs. 92* on the medium FL was 98,7 mg/g. Funding of the work has been done under the project "Development of the technology to produce feed additive based on the use of lysine, threonine and methionine" on interstate target program of the Eurasian Economic Community "Innovative Biotechnologies" for 2012-2014.

Keywords: lysine, producing strain, high performance liquid chromatography.