

На правах рукописи

**РГБ ОЛ**

22 ДЕК 2000

**Сенаторова Валентина Николаевна**

**Исследование процесса и создание технологии биосинтеза**

**L-триптофана штаммом-продуцентом *Bacillus subtilis*  
ВНИИгенетика-15.**

**03.00.23 – Биотехнология**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата технических наук**

**Москва–2000**

Работа выполнена в Государственном научно-исследовательском институте биосинтеза белковых веществ (ГосНИИсинтезбелок)

- Научный руководитель: - доктор технических наук, ст. н. сотр.  
Музыченко Леонид Афанасьевич
- Официальные оппоненты: - доктор биологических наук, профессор  
Грачева Ирина Михайловна
- кандидат технических наук,  
Макимова Екатерина Анатольевна
- Ведущая организация: - АООТ «Биохиммаш»

Защита состоится «5» XII 2000г. в 12<sup>00</sup> часов на заседа-

нии диссертационного совета Д 053.34.13. в Российском химико-технологическом университете им. Д.И.Менделеева (125047, Москва, Миусская пл., 9).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Российского химико-технологического университета им. Д.И.Менделеева.

Автореферат разослан «2» XI 2000г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



И.И.Гусева

Л662.261.371-13,0  
Л 115 124 1-12 0

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. L-триптофан – незаменимая для человека и животных аминокислота, играет существенную роль в обмене веществ живых организмов. Недостаток его приводит к различным заболеваниям: рак, диабет, туберкулез, пеллагра, различные заболевания нервной системы, у животных снижаются привесы, развивается анемия.

L-триптофан применяется в медицинской практике в составе кровезаменителей, для лечения умственно отсталых детей, как транквилизатор; в качестве пищевых добавок (в составе аминокислотных смесей) для спортсменов в период тренировок; в сельском хозяйстве для балансировки кормов с целью повышения привесов.

Учитывая, что потребность нашей страны в медицинском L-триптофане около 50 т/год, а в кормовом – около 200 т/год, создание технологии биосинтеза L-триптофана представляется актуальным.

Цель работы. Разработка и совершенствование технологии биосинтеза L-триптофана, позволяющей наладить промышленное производство и максимально снизить себестоимость конечного продукта, включает в себя: изучение динамики, стехиометрии, путей биосинтеза, подбор оптимальных условий культивирования (оптимизация состава питательной среды), изучение влияния условий культивирования на морфологию клеток штамма-продуцента L-триптофана *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15; подбор адекватной модели роста, биосинтеза, потребления редуцирующих веществ и кислорода; разработка технологии биосинтеза (определение параметров периодического, полупериодического, отъемно-доливного процессов биосинтеза); опытно-промышленное опробование разработанной технологии.

Научная новизна. Для штамма *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15

- впервые определены морфометрические характеристики и влияние на них условий культивирования,
- показано, что даже кратковременное нахождение клеток продуцента в лимите по кислороду ведет к их значительному лизису,
- установлено, что источником ростового фактора при биосинтезе триптофана является кукурузный экстракт,
- подобрана и проверена на адекватность математическая модель биосинтеза триптофана, учитывающая рост, биосинтез и потребление редуцирующих веществ и кислорода

Впервые разработана и опробована в опытно-промышленных условиях технология биосинтеза L-триптофана на штамме-продуценте *Bacil-*

*lus subtilis* ВНИИГенетика-15, подобрана адекватная математическая модель роста, биосинтеза и потребления субстрата, проведена работа по определению влияния условий культивирования на морфометрические характеристики клеток продуцента.

**Практическая ценность.** Разработанная технология позволяет организовать в нашей стране производство кристаллического кормового и медицинского L-триптофана микробиологическим способом на простых минеральных средах с конкурентоспособной себестоимостью по сравнению с зарубежными аналогами. Проведено успешное опытно-промышленное опробование разработанной технологии на различных заводах СССР.

**Апробация.** Результаты работы докладывались на четырех научных конференциях.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 2 статьи, получено 2 авторских свидетельства, результаты были опубликованы в материалах четырех научных конференций.

**Структура и объем работы.** Работа состоит из введения и 5-ти глав, библиографического описания (147 наименований) и изложена на 156 стр. машинописного текста.

**В первой главе** показана актуальность работы, сделан аналитический обзор публикаций на тему работы и представлены основные положения, выносимые на защиту.

**Вторая глава и третья глава** содержат экспериментальную часть работы, в которой подбираются оптимальные компоненты питательной среды, и проводится морфометрический анализ влияния условий культивирования на клетки продуцента.

**Четвертая и пятая главы** посвящены подбору адекватных моделей роста, биосинтеза, потребления редуцирующих веществ и кислорода; в ней изложены основные принципы разработки технологии биосинтеза L-триптофана, сравнительные характеристики полупериодического и объемно-доливного способов ведения процесса биосинтеза, осуществлен расчет оптимальных условий проведения технологического процесса, представлены результаты опытно-промышленного опробования разработанной технологии.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

### 1. Литературный обзор.

В литературном обзоре L-триптофан подробно охарактеризован как кормовая добавка, рассмотрено его применение в качестве биологически активной пищевой добавки и лекарственного средства. Указывается, что интерес к производству L-триптофана, во всем мире очень велик. Объ-

ны производства аминокислот возрастают, основными производителями являются Япония и США.

Рынок аминокислот растет со скоростью 12-15% в год

С целью правильного понимания процессов, происходящих при синтезе L-триптофана, принятия решений при создании питательных сред и получения верных объяснений возникающих затруднений при реализации технологического процесса в главе I подробно рассмотрены биохимические процессы, ведущие к образованию L-триптофана.

Также сделан обзор литературы по известным способам микробиологического синтеза, разработанным зарубежными и отечественными авторами.

На основании материалов, рассмотренных в главе I, сделан вывод том, что

получение одной из незаменимых аминокислот – L-триптофана с целью использования его в качестве биологически активной пищевой и кормовой добавки – важная народно-хозяйственная задача

и сформулированы цель и задачи исследования.

## Глава 2. Материалы и методы.

В этой главе приводится краткая характеристика штамма-продуцента L-триптофана, методика его поддержания и хранения; методики получения посевного материала и проведения опытов в колбах и лабораторных ферментерах; методы аналитического и морфометрического контроля; методика обработки результатов экспериментов.

Для сравнительной оценки перспективности различных источников углерода, с целью их практического применения мы использовали, коэффициент экономической эффективности ( $Q_3$ , руб/кг), который является рошенным вариантом приведенных затрат.

## Глава 3. Определение оптимальных условий культивирования.

В результате первоначальных исследований была определена питательная среда для биосинтеза штамма-продуцента L-триптофана *Bacillus subtilis* ВНИИгенетика-15 следующего состава (г/л): сахароза или сахар-рец – 100,0; кукурузный экстракт – 25,0;  $KH_2PO_4$  – 0,6;  $K_2HPO_4$  – 1,4;  $3SO_4 \cdot 7H_2O$  – 1,0; NaCl – 0,5; мочевины – 5,0 (контроль).

В качестве источников углерода, позволяющих заменить сахар в питательной среде для биосинтеза L-триптофана, были испытаны глюкозо-содержащие отходы различных производств: ферментативный гидролизат пшеницы (отход производства фурфурола при гидролизе древесины), патока свекловичная и тростниковая, патока зеленая (отход крахмало-

паточного производства), зерновой ферментолитат, заваренная кукурузная мука, гидролизат крахмала из зерна.

При изучении влияния различных ростовых веществ на биосинтез L-триптофана помимо обычного товарного кукурузного экстракта использовали: очищенный кукурузный экстракт; замочную воду, полученную при замачивании зерна; ферментолитат БВК и дрожжевой гидролизат; аминокислоты (треонин, лизин, аргинин, аланин, валин, пролин, тирозин, серин, глутаминовая кислота, фенилаланин, глицин, триптофан), входящие в состав кукурузного экстракта. Опыт по влиянию аминокислот проводился методом случайного баланса на фоне 1,5% содержания товарного кукурузного экстракта в питательной среде. Были испытаны также следующие источники азота: мочевины,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ .

Полученные при этом результаты приводятся в таблицах 1-3.

Таблица 1.

Использование различных источников углерода для биосинтеза L-триптофана.

Источник углерода	Г, г/л	РВ, %		$\alpha^{*}$ , %	Q <sub>с</sub> , руб/кг
		нач.	кон.		
1	2	3	4	5	6
<u>1. Меласса</u>					
Тростниковая					
- неочищенная	5,5	8,6	5,7	18,3	167,7
- очищенная (рН 6,0, 20 мин. 80°С)	6,0	8,6	1,6	8,6	183,4
Свекловичная					
- неочищенная	4,7	7,0	1,0	7,8	250,9
- очищенная	6,0	8,0	-	7,5	211,7
Контроль	8,5	10,0	1,0	9,4	226,5
<u>2. Патока зеленая</u>	7,4	10,0	1,6	8,8	174,4
Контроль	7,1				226,5
<u>3. Гидролизат лигноцеллюлозы</u>					
- неочищенный	4,5	6,0	-	6,2	281,1
- очищенный (к-та)	5,7	7,0	0	8,1	263,5
- очищенный (ультрафильтрация)	5,6	4,0	0,27	15,1	
<u>4. Гидролизат древесины</u>					
100%	-	8,5	-	-	
75%+сахароза	6,9	8,5	4,1	15,7	
<u>5. Гидролизат крахмала зерна + замочная вода</u>	7,1	10,0	2,4	9,2	183,8
Контроль	6,6				226,5

1	2	3	4	5	6
<u>6. Заваренная кукурузная мука</u>					
Обработка после прогрева до 70°C амилосубтилином, 30 мин. + стерилиз.	5,8	2,3	0,58	34,1	
Амилосубтилин+глокавоморин	7,75	10,0	2,7	10,6	
Контроль	7,05				226,5
<u>7. Фугат осахаренного зерна</u>	7,7	10,0	0,73	8,3	
Контроль	6,25				
<u>8. Зерновой ферментоллизат</u>	9,0	10,0	2,2	11,5	
Контроль	8,4				226,5

\*) Коэффициент конверсии

Из анализа данных таблицы 1 видно, что все исследованные источники углерода утилизируются штаммом *Bac. subtilis* ВНИИ Генетика-15, но выход L-триптофана и конверсия различны.

Был сделан вывод, что сахар-сырец (или сахароза) – наиболее предпочтительный источник углерода в составе питательной среды для биосинтеза L-триптофана.

Из опробованного альтернативного сырья лучшие результаты по продуктивности получены на глюкозе, гидролизате крахмала зерна, зерновых ферментоллизатах.

Опыты с источниками азота (табл. 2) показали, что  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  отрицательно влияет на биосинтетическую активность культуры. Соли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в составе среды снижают выход L-триптофана.

Хорошие результаты дала замена мочевины на  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  в соотношении 1:4 и 2:3. На основании проделанных опытов в качестве основного источника азота была принята мочевина.

Таблица 2.  
Влияние различных источников азота на биосинтез L-триптофана

Исследуемый фактор	Г, г/л	РВ, %		$\alpha$ , %	Q <sub>с</sub> , руб/кг
		нач.	кон		
1	2	3	4	5	6
<u>Различные соли аммония</u>					
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 7 г/л	3,9	10,0	4,8	7,5	510,8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 г/л	1,8		7,2	6,4	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ 5 г/л	5,3		3,8	8,5	266,7
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (100%)	1,9		3,8	3,1	

1	2	3	4	5	6
(20%+80% мочевины)	7,6		1,0	8,4	193,8
(40%+60% мочевины)	7,2		0,6	199,7	7,7
(60%+40% мочевины)	5,6		2,6	7,6	275,4
(80%+20% мочевины)	3,7		2,2	4,7	555,6
0,8% мела + 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +0,1% мочевины	6,3		2,2	8,1	
Мочевина 75%+25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 19 час. роста + подтитр. NaOH	6,2		0,8	6,7	
Контроль (мочевина 0,5%)	7,2		0,24	7,8	226,5

Результаты опытов, приведенные в табл.3., показывают, что культура способна утилизировать широкий спектр источников амминого азота, но кукурузный экстракт - более предпочтительный компонент питательной среды.

Таблица 3.

Влияние различных источников ростовых факторов на биосинтез L-триптофана

Источник ростового фактора	Т, г/л	РВ, %		$\alpha$ , %	Q, руб/кг
		нач.	кон.		
1	2	3	4	5	6
<u>Кукурузный экстракт</u>					
- неочищенный (контроль)	6,5	10,0	1,4	9,1	226,4
- очищенный	7,8		2,2	9,6	244,0
<u>Замочная вода</u>					
20% (по объему)	7,3	10,0	-	7,3	183,13
30%	7,9		-	7,9	
40%	8,1		-	8,1	
<u>БВК</u>					
Ферментализат БВК	6,0	10,0	-	6,0	-
Автолизат БВК	4,5			4,5	

Однако необходимо отметить, что разработанная технология биосинтеза L-триптофана на гидролизате крахмала зерна позволяет использовать замочную воду в качестве источника ростовых факторов вместо кукурузного экстракта. При этом выход конечного продукта повышается на 10%. КЖ содержит меньше пигментов, что упрощает процесс очистки.

Сравнение результатов, полученных в опыте по влиянию аминокислот на биосинтез L-триптофана (метод случайного баланса) с аналогичным, ранее проведенным, исследованием штамма *Bac. subtilis* 3557, показало, что при селекции штамма ВНИИгенетика-15 были произведены суще-



ственные изменения в процессах метаболизма по сравнению с типичными для *Bac. subtilis* процессами. Присутствие L-аргинина среди положительно влияющих аминокислот подтверждает высказанную ранее гипотезу о роли мочевины в биосинтезе L-триптофана.

С целью создания дополнительных приемов контроля за развитием культуры *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15 были изучены морфометрические характеристики клеток в регламентных условиях и при их отклонениях от оптимума (в условиях с пониженной аэрацией).

Исследование морфологии культуры *Bac. subtilis* проводили при культивировании в ферментере. Морфометрические измерения ( $l$ ,  $d$ ;  $K_0$ -  $l/d$ ,  $K$ -  $S/V$ ) производили на тотальных препаратах в просвечивающем электронном микроскопе JEM-6G-JEOL. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Проведенные эксперименты по культивированию *Bac. subtilis* в различных условиях подтверждают правильность сделанных предположений о существовании корреляции между физиологическим состоянием культуры и морфометрическими характеристиками клеток, а также правильность выбора параметра  $K(S/V)$  для оценки физиологического состояния штамма-продуцента. Проведенные эксперименты убедительно доказывают недопустимость пребывания клеток продуцентов L-триптофана в условиях лимита по кислороду, так как в это время не только тормозится биосинтез, но и происходят необратимые морфометрические изменения и массовая гибель клеток.

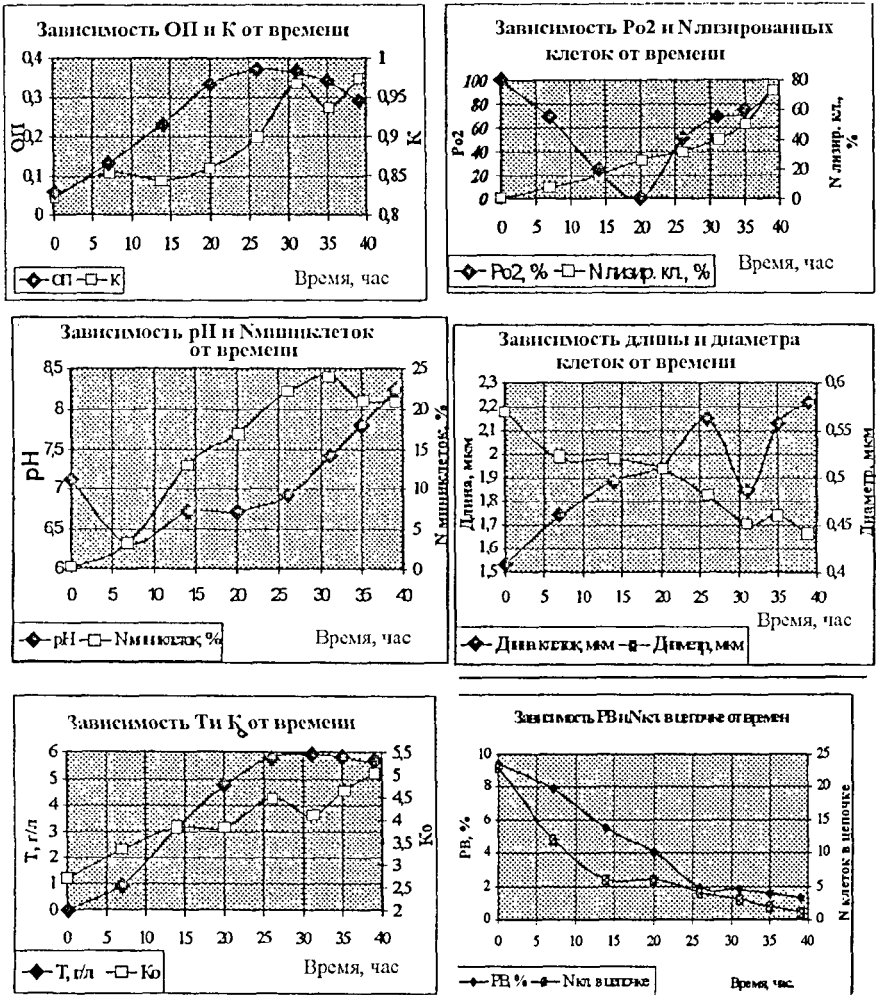


Рис. 1. Мормометрические и физиологические характеристики штамма-продуцента *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15 при культивировании в регламентных условиях.

#### Глава 4. Изучение динамики роста и биосинтеза.

В работах, посвященных разработке технологии биосинтеза L-триптофана, приводятся либо данные по содержанию L-триптофана в культуральной жидкости, либо динамика изменения концентрации биомассы, триптофана и редуцирующих веществ в ходе периодического процесса биосинтеза.

В то же время, создание математической модели биосинтеза L-триптофана, даже по уже полученным данным позволило бы существенно облегчить анализ достигнутых результатов и определить пути их оптимизации.

Для создания такой модели нами были использованы усредненные данные нескольких операций, проведенных в условиях экспериментально-технологического центра ГосНИИсинтезбелок (табл. 4).

Таблица 4.

Динамика роста и биосинтеза L-триптофана штаммом *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15

Продолжительность процесса, час (t)		0	4	8	12	16	20	22,5	Погрешность
Оптическая плотность, ед (X)	Эксп.	.007	.015	.052	.112	.177	.292	.337	±0,01
	Выч.	.007	.019	.048	.107	.195	.295	.340	±0,01 4
Концентрация триптофана, г/л (P)	Эксп.	0	0,1	0,6	0,9	2,8	5,0	6,2	±0,3
	Выч.	0	0.1	0.56	1.40	2.46	4.95	6.27	±0,3
Концентрация РВ, г/л (S)	Эксп.	94	93	89	80	63	46	31	±3
	Выч.	94	93.1	88.2	79.3	67.8	42.6	31.00	±3.19
Скорость потребления O <sub>2</sub> , г/л·час, (W <sub>o</sub> )	Эксп.	-	0.27	1.28	3.32	4.07	4.20	4.72	± 0.4
	Выч.		0.47	1.43	2.27	3.87	5.02	4.77	± 0.53
Сульфитное число, гO <sub>2</sub> /л·час, (K <sub>1a</sub> )	Эксп.	2.25	2.25	2.25	4.0	4.9	6.0	6.0	± 0.3

Проверка на адекватность модели Моно после приведения ее к интегральной форме

$$t = \frac{1}{\mu_m} \cdot \left(1 + \frac{K_R}{X_{np}}\right) \cdot \ln \frac{X}{X_0} + \frac{K_R}{\mu_m \cdot X_{np}} \cdot \ln \frac{X_{np} - X_0}{X_{np} - X} \quad (1)$$

где  $X_{np}$  – некоторое предельное значение  $X$ , определяемое начальным значением  $R(R_0)$ , которое достигается при  $t = \infty$

дана:  $\mu_m = -0.2707$ ,  $K_R = -1.0947$ ,  $X_{np} = 0.535$ . Средняя квадратичная погрешность при определении  $X = \pm 0.010$ .

Предложенный метод дает отрицательные значения  $\mu_m$  и  $K_R$ , которые не имеют физического смысла, хотя и удовлетворительно описывает экспериментальные данные. Уравнение Моно можно переписать в более удобном виде, используя  $\mu_m^* = -\mu_m$  и  $K_R^* = -K_R$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m^* \cdot \frac{X_{np} - X}{X_{np} - X + K_R^*} \cdot X \quad (2)$$

Полученный результат можно использовать для практических расчетов.

С целью придания коэффициентам используемой модели физического смысла мы рассмотрели уравнение Моно «усложненное» добавлением сомножителя, учитывающего ингибирование роста неким продуктом (т.е. уравнение Моно-Иерусалимского), в котором предположили, что концентрация этого продукта пропорциональна концентрации биомассы. Тогда

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \frac{X_{np} - X}{X_{np} - X + K_R} \cdot \frac{1}{1 + K_i \cdot X} \cdot X \quad (3)$$

где  $K_i$  – эмпирическая константа (“константа ингибирования”)

При отсутствии ингибирования ( $K_i = 0$ ) уравнение (3) переходит в уравнение Моно. Легко видеть также, что при  $K_R \gg X_{np} - X$  уравнение (3) приобретает вид (2).

После интегрирования уравнение (3) приобретает вид

$$t = \frac{K_i}{\mu_m} \cdot (X - X_0) + \frac{1}{\mu_m} \cdot \left(1 + \frac{K_R}{X_{np}}\right) \cdot \ln \frac{X}{X_0} + \frac{K_R}{\mu_m} \cdot \left(K_i + \frac{1}{X_{np}}\right) \cdot \ln \frac{X_{np} - X_0}{X_{np} - X} \quad (4)$$

где  $X_0$  – начальная концентрация биомассы

Было найдено, что  $\mu_m = 0.303$ ,  $K_R = 0.0507$ ,  $K_i = 4.515$ ,  $X_{np} = 0.36$ .

Выше было показано, что источником ростового фактора при биосинтезе L-триптофана является кукурузный экстракт и, поэтому мы можем считать лимитирующей концентрацию кукурузного экстракта. Это предположение было проверено в полупериодическом процессе с подачей подпитки, содержащей кукурузный экстракт. Стехиометрический коэффициент  $\alpha$  определялся как средневзвешенное значение «массы» продуцента в биореакторе  $G_x = V \cdot X$ , где  $V$  – объём культуральной жидкости, и общего количества внесенного кукурузного экстракта  $G_R = c_{R0} \cdot V_0 + c_{Rf} V_f$  по формуле

$$\alpha = \frac{\sum_{i=1}^N G_R \cdot \Delta G_x}{\sum_{i=1}^N G_R^2} \quad (5)$$

Для определения стехиометрического коэффициента  $\alpha$  были использованы данные, приведенные в таблице 5. Этот эксперимент является продолжением эксперимента, описанного в таблице 4.

Таблица 5.

Результаты полупериодического культивирования штамма продуцента

Время, час.	22,5	24	28	32	36	40	44	46
V, л	10,05	10,17	10,48	10,81	11,14	11,49	11,84	12,03
$X_{np}$ , ед. ОП	.368	-	.752	-	.794	.835	.876	.894
$X^p$ , ед. ОП	.489	-	.616	-	.768	.823	.896	.925

Стехиометрический коэффициент  $\alpha$  оказался равным 1.516. В периодическом процессе  $X_{np} = 0.01516c_{R0} \pm 0.046$

Для описания процесса биосинтеза было использовано уравнение Людекинга и Пайри

$$\frac{dP}{dt} = a_p \cdot \frac{dX}{dt} + b_p \cdot X \quad \text{или} \quad \mu_p = a_p \cdot \mu_x + b_p \quad (6)$$

где  $P$  – концентрация продукта,  $a_p$  и  $b_p$  – эмпирические константы.

С помощью подстановки  $X \cdot dt = \frac{dX}{\mu_x}$  преобразуем (6) к виду

$$dP = a_p \cdot dX + b_p \cdot \frac{dX}{\mu_x}$$

и, поскольку при  $t = 0$   $P = 0$ ,

$$P = a_p \cdot (X - X_0) + b_p \cdot \int \frac{dX}{\mu_x} \quad (7)$$

Применяя для конкретного решения (8) модель Моно-Иерусалимского, получим после интегрирования

$$P = \left[ a_p + \frac{b_p}{\mu_m} \cdot (1 - K_i \cdot K_R) \right] \cdot (X - X_0) + \frac{b_p \cdot K_i}{2\mu_m} \cdot (X^2 - X_0^2) + \frac{b_p \cdot K_R}{\mu_m} \cdot (1 + K_i \cdot X_{np}) \cdot \ln \frac{X_{np} - X_0}{X_{np} - X} = a_p \cdot (X - X_0) + b_p^* \cdot z \quad (8)$$

$$\text{где } z = [(1 - K_i \cdot K_R) \cdot z_0 + \frac{K_i \cdot z_3}{2} + K_R \cdot (1 + K_i \cdot X_{np}) \cdot z_2] / \mu_m$$

Далее определяем  $a_p = 5.46$  и  $b_p = 1.62$ . Вычисленные, с применением этих коэффициентов, значения концентраций L-триптофана приводятся в таблице 4.

Можно предположить, что источник углерода при микробиологическом синтезе расходуется в трех основных процессах: затраты на синтез биомассы, затраты на синтез продукта, затраты на метаболические процессы.

Иначе говоря,

$$- \frac{dS}{dt} = a_s \cdot \frac{dX}{dt} + b_s \cdot X + c_s \cdot \frac{dP}{dt} \quad (9)$$

где  $a_s$ ,  $b_s$  и  $c_s$  – эмпирические константы,  $S$  – концентрация источника углерода.

Если связь между ростом и биосинтезом описывается уравнением (7), то

$$- \frac{dS}{dt} = a_s^* \cdot \frac{dX}{dt} + b_s^* \cdot X = (a_s^* \mu_x + b_s^*) \cdot X \quad (10)$$

е  $a_s^*$  и  $b_s^*$  – эмпирические константы

Далее, по аналогии с описанием процесса биосинтеза, получим

$$S_0 - S = a_s^* \cdot z_0 + b_s^* \cdot z_4 \quad (11)$$

где  $a_s^* = 68.12$  и  $b_s^* = 13.68$ . Значения  $S$ , вычисленные с использованием уравнения (11) приводятся в таблице 4.

В связи с низкой растворимостью кислорода в воде скорость его потребления можно принять равной скорости растворения

$$K_L a \cdot (P - \pi) = W_0 \quad (12)$$

где  $K_L a$  – объемный коэффициент массопереноса кислорода, г  $O_2$ /л·час·атм,  $P$  – среднее давление воздуха в слое культуральной жидкости,

атм. (в нашем случае  $P=1$ ),  $\pi$  – концентрация растворенного кислорода в долях от насыщения при атмосферном давлении воздуха.

С другой стороны, поскольку кислород также является субстратом, можно записать, что  $W_o = (a_o \mu_x + b_o) \cdot X$ . Обработывая эти данные с использованием уравнения (12) и значений  $\mu_x$ , рассчитанных по уравнению (3) с применением определенных ранее  $\mu_m$ ,  $K_r$ ,  $K_i$ ,  $X_{np}$ , а также  $X^2$ , мы получили значения  $a_o = 81.5$ ;  $b_o = 11.1$  и вычислили  $W_o$  (см. табл. 4). Поскольку в ходе биосинтеза скорость роста ( $W_x = \mu_x X$ ) проходит через максимум, значение  $W_o$  также должно иметь максимум. Решая уравнение  $dW_o/dt = 0$  получим для уравнения Моно-Иерусалимского соотношение

$$\mu_x = \frac{b_o}{a_o \left\{ \left[ \frac{K_i}{1 + K_i X} + \frac{K_R}{(X_{np} - X)(K_R + X_{np} - X)} \right] X - 1 \right\}} \quad (13)$$

Для используемых нами значений параметров значение  $X_m$ , при котором достигается минимум концентрации растворенного  $O_2$  и максимум  $W_o = 30,2$ . При этом  $W_{om} = 5,04$ ,  $\pi_m = 0,16$  (при  $K_{La} = 6$ ).

В итоге процесс биосинтеза L-триптофана, показатели которого приведены в таблице 4, адекватно описывается моделью

$$\begin{aligned} \frac{dX}{dt} &= 0.303 \cdot \frac{0.36 - X}{0.0507 + 0.36 - X} \cdot \frac{X}{1 + 4.515 \cdot X} \\ \frac{dP}{dt} &= 5.45 \cdot \frac{dX}{dt} + 1.63 \cdot X \\ \frac{dS}{dt} &= - \left( 68.12 \cdot \frac{dX}{dt} + 13.68 \cdot X \right) \\ K_{La} \cdot (1 - \pi) &= 81.5 \cdot \frac{dX}{dt} + 11.1 \cdot X \end{aligned} \quad (14)$$

## Глава 5. Разработка технологии биосинтеза.

С целью продления фазы логарифмического роста, что позволит повысить концентрацию конечного продукта, мы использовали дробную подачу дополнительной питательной среды (подпитки).

Процесс исследовался в следующих направлениях:

- определение оптимального состава подпитки по основным компонентам питательной (по плану полного факторного эксперимента),
- выбор параметра, позволяющего определить момент подачи подпитки (РВ, рН,  $PO_2$ , ЕН, а также  $CO_2$  и  $O_2$  на выходе);

Выяснилось, что концентрация растворенного кислорода в среде - наиболее четкий и оперативный показатель, позволяющий определить момент подачи подпитки.

Процесс биосинтеза L-триптофана с подпиткой по датчику  $PO_2$  позволил увеличить выход конечного продукта в среднем на 30%.

Далее во избежание лимитирования по кислороду в логарифмической фазе роста был разработан процесс с подпиткой и регулированием аэрации. Условия аэрации изменяли так, чтобы  $PO_2$  не опускался ниже 15%. С помощью этого технологического приема удалось повысить концентрацию триптофана в конце ферментации на 20%, сьем с единицы объема за счет увеличения объема подпитки, скорость и продуктивность биосинтеза.

На способ получено авторское свидетельство, составлены лабораторный и опытно-промышленный регламенты.

Результаты описанных выше исследований суммированы в таблицах 6 и 7.

Таблица 6.

Результаты экспериментального исследования полупериодического процесса биосинтеза L-триптофана.

Условия культивирования	Т, г/л	РВ, %		$\alpha$ , %	$Q_p$ , руб/кг
		Нач.	Кон.		
1	2	3	4	5	6
<b>1. Подпитка по <math>PO_2</math></b>					
$V_o=1,5$ л $V_n=0,025$ л, $V_c=1,4$ л,	8,3	10,0	-	7,3	196,3
$V_o=1,5$ л $V_n=0,1$ л, $V_c=1,44$ л,	10,0		0,5	8,1	166,2
$V_o=15$ л $V_n=3,7$ л, $V_c=16,8$ л,	10,75		-	6,5	192,4
1	2	3	4	5	6
<b>2. Подпитка по <math>pO_2</math> + с.ч.</b>					
$V_o=1,5$ л $V_n=0,537$ л, $V_c=1,9$ л,	11,6	10,0	1,3	7,0	194,3
$V_o=1,5$ л $V_n=0,169$ л, $V_c=1,5$ л,	12,25		0,24	8,9	145,2
$V_o=13,0$ л $V_n=2,8$ л, $V_c=12$ л,	12,4		1,2	6,5	184,9
<b>3. Подпитка по pH, <math>PO_2</math> + с.ч.</b> (на очищ. кук. экстракте), $PO_2$					
$V_o=10$ л $V_n=5,43$ л, $V_c=14,3$ л,	13,2	10,8	2,15		193,0
$V_o=10$ л $V_n=3,32$ л, $V_c=11,5$ л,	12,6	9,4	0,7		179,9
$V_o=1,5$ л $V_n=0,6$ л, $V_c=1,71$ л,	7,3	7,2	0	10,6	415,9
$V_o=1,5$ л $V_n=0,14$ л, $V_c=1,425$ л,	7,5	8,4	0,5	5,8	271,7
$V_o=1,5$ л $V_n=0,227$ л, $V_c=1,7$ л,	6,2	6,8	0,3	6,4	341,7
$PН$ $V_o=1,5$ л $V_n=0,24$ л, $V_c=1,415$ л	8,8	8,9	2,0	11,6	259,0

$V_o$  - нач. объем питательной среды;  $V_n$  - объем подпитки,  $V_c$  - объем слива



Таблица 7.

Результаты оптимизации состава питательной среды и подпитки.

Условия культивирования		Т, г/л	РВ, %		α, %	Q, руб/кг
			Нач.	Кон.		
1		2	3	4	5	6
Оптимизация питательной среды	Сахар, кукурузный экстракт, мочеви́на (Симплекс-метод) РВ=10,0%; кук.э.=2,5; мочев.=0,5 (контроль)	6,9	10,0	3,6	10,8	226,5
Оптимизация состава подпитки	1. Сахар, кук.э., мочеви́на (ПФЭ)	8,7	10,0	0,2	7,7	226,5
		9,4		1,2	5,9	
	РВ=35%; кук.э.=15%; мочев.=2,0%	8,5	2,1	6,7		
	Контроль	8,3	1,6	6,6		
	Контроль	7,6	0,3	6,2		
	2. Подпитка без кук. э. сахар и мочеви́на раздельно V <sub>о</sub> =1,5л V <sub>п</sub> =0,34л V <sub>с</sub> =1,6л	11,25	9,0	1,0	6,7	
V <sub>о</sub> =1,5л V <sub>п</sub> =0,43л V <sub>с</sub> =1,7л	10,0	9,4	1,8	6,3	225,9	

С целью исключения потерь времени на загрузку ферментера, его стерилизацию и выращивание посевного материала часто используют отъемно-доливной способ ведения процесса ферментации.

Известный способ получения L-триптофана отъемно-доливным способом для шт. 3557 предусматривал проводить слив КЖ при достижении концентрации РВ = 3,0%, что не всегда соответствует моменту смены фаз, а слив во второй фазе приводит к снижению активности культуры в последующих циклах.

Мы попытались устранить этот недостаток, определяя момент слива-долива по сигналам датчиков Р<sub>о2</sub> или рН.

Отъемно-доливной способ по сигналу датчика Р<sub>о2</sub> или рН позволил стабилизировать процесс на протяжении 10-12 циклов и получать в среднем 6 г/л L-триптофана каждые 12-14 час. роста (табл.8). Продуктивность процесса возросла в 3 раза по сравнению с периодическим процессом. Недостатком этого способа ферментации является наличие остаточных сахаров в КЖ (2,5-3,0%), что приводит к необходимости использовать на стадии выделения ионный обмен.

Оптимальный объем слива 85%. Время цикла 12±2 час. роста, Т=6,5±1,0 г/л, РВ<sub>остат.</sub>=2,2±1,0 %, продуктивность процесса 0,222 г/л час.

При реализации этого способа стоки с ионообменных колонн поле выделения L-триптофана, содержащие 3,0-3,5% РВ, используют для приготовления исходной питательной среды.

Таблица 8.

Результаты биосинтеза L-триптофана штаммом  
*Vac. subtilis* ВНИИГенетика-15 отъемно-доливным методом.

Условия проведения процесса	Т, г/л	Концентрация РВ, %		α, %
		начало	конец	
1	2	3	4	5
<b>Отъемно-доливной способ</b>				
по РВ				
4 долива 144 час. V <sub>0</sub> =15 л	5,0	10,0	3,3	
по pO <sub>2</sub>				
1.(24 час.)	6,0	9,3	2,8	9,2
2.(13 час.)	6,4	9,2	3,5	11,2
3.(15 час.)	7,7	8,0	2,8	11,9
4.(14 час.)	5,3	8,5	3,6	12,3
5.(14 час.)	5,3	6,4	2,1	12,3
6.(14 час.)	5,3	6,4	2,1	12,3
7.(17 час.)	7,4	8,4	2,4	12,3
8.(19 час.)	4,7	8,7	1,7	7,8
9.(18 час.)	4,4	8,4	1,2	6,1
10.(10 час.)	2,8	7,5	2,7	5,8
11.(15 час.)	4,4	9,0	2,5	6,8

На способ получено авторское свидетельство, составлены лабораторный и опытно-промышленный регламенты.

Разработанные в лабораторных условиях процессы ферментации) прошли опробование на опытно-промышленной установке института (V=30 л, 100 л), на опытно-промышленной установке Киевского завода бактериальных препаратов (V=630 л), на Фрунзенском заводе антибиотиков (V=2м<sup>3</sup>, 16 м<sup>3</sup>), Степногорском заводе «Прогресс» (V=630 л), Бердском заводе биопрепаратов (V=16 м<sup>3</sup>).

Таблица 9

Результаты опытно-промышленных испытаний.

Завод	Способ ферментации	Объем биореактора	Т, г/л	α, %
1	2	3	4	5
Киевский завод бакпрепаратов 1981 г.	Подпитка по P <sub>02</sub> и pH	1,2 м <sup>3</sup>	6,1	4,4
1982 г.	-"	630 л	9,6	1,1
1984 г.	Отъем-долив	630 л	5,5-7,2 (4 цикла)	2,5-3,8

1	2	3	4	5
Фрунзенский завод ангиобиотиков 1983г.	Подпитка по $PO_2$ и рН	16 м <sup>3</sup>	8,7	2,2
1989 г.	-"	2 м <sup>3</sup>	5,6; 6,4	3,3
Степногорск, завод «Прогресс», 1993г.	-"	630 л	6,4 8,2 6,6 8,2	0,7 0,9 0,0 0,9
Бердский завод биопрепаратов, 1999 г.	-"	16 м <sup>3</sup>	7,8 8,2	0,3 0,3

Результаты оформлены актами испытаний, составлены опытно-промышленные регламенты.

На опытно-промышленных установках перечисленных заводов проходило освоение лабораторных регламентов с целью разработки опытно-промышленных регламентов и получения опытных партий L-триптофана.

С использованием математической модели (14) мы определили оптимальную стратегию проведения технологического процесса:

- процесс проводится периодически до достижения  $X_m$ , при этом должны максимально использоваться массообменные возможности биореактора: выбирается максимально допустимое значение  $KЭ_0$ , затем рассчитывается соответствующее ему значение  $S_0$ .

- если вычисленное значение  $S_0 > 150$  г/л, излишнее количество вводится в виде концентрированной добавки ( $S_p = 600$  г/л) так, чтобы всегда  $S \geq S_{кр} = 5$  г/л

- по достижении  $X = X_m$ , в КЖ добавляется ростовой фактор вычисленными порциями через заданные промежутки времени, так чтобы  $X_{пр} \leq X_{прт}$ .

Ниже приводятся результаты расчета процесса при использовании биореактора, обеспечивающего скорость растворения кислорода при атмосферном давлении 5 кг  $O_2$ /м<sup>3</sup>час (давление под крышкой  $P = 1,9$ ). Процесс проводится в биореакторе объемом 100 м<sup>3</sup> в течение 48 час. Начальный объем  $V_0 = 55$  м<sup>3</sup>,  $S_0 = 150$  г/л,  $KЭ_0 = 42$  г/л.

При этом  $X_m = 55,57$  и  $\tau_m = 25,1$  ч,  $P_m = 10,1$  г/л;  $DS = S_0 - S = 100,7$  г/л. Начало подачи подпитки – 26 час. и далее через 2 часа. Результаты расчета приведены в таблице 10.

Таблица 10.  
 Результаты расчета процесса биосинтеза L-триптофана с подкачей  
 ростового фактора в ходе ферментации.

t, час	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
X <sub>т</sub> , ед. ОП	58,5	63,4	67,1	69,9	72,0	73,6	74,9	75,8	76,5	77,1	77,5	77,8
X <sub>удл,оп</sub>	64,3	66,7	69,2	71,3	73,0	74,4	75,4	76,2	76,8	77,3	77,7	77,9
μ <sub>х</sub> , 1/час	.0472	.0332	.0239	.0175	.0129	.0096	.0072	.0054	.0041	.0031	.0023	.0018
W <sub>р</sub> , г/л час	1,07	1,13	1,17	1,20	1,22	1,24	1,25	1,25	1,27	1,27	1,28	1,28
ΔКС, кг	16	86	91	77	62	49	38	29	22	17	13	10
V <sub>р</sub> , м <sup>3</sup>	1,1	3,4	6,5	9,0	11,1	12,7	14,0	15,0	15,7	16,3	16,7	17,1
P, г/л	10,9	12,6	14,0	15,5	17,0	18,6	20,2	21,9	23,7	25,4	27,2	29,0
S/л	51	54	63	68	68	64	58	49	39	27	15	2
Уд. расход S, г/г	10,33	10,08	9,87	9,68	9,52	9,39	9,28	9,18	9,09	9,02	8,95	8,89

### Выводы.

1. Культура *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15 способна утилизировать такие источники углерода как сахар, глюкозу, патоку зеленую, ферментативный гидролизат целлолигинина, мелассу, заваренную кукурузную муку, осахаренную кукурузную муку, осахаренное зерно (с помощью ферментов и посредством гидролиза), однако сахар-сырец является предпочтительным источником углерода в составе питательной среды для промышленного биосинтеза L-триптофана.

2. В качестве источника аминного азота при биосинтезе L-триптофана культурой *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15 могут быть использованы кукурузный экстракт, ферментализаты БВК, дрожжевые БВК, замосная вода, однако в качестве основного источника ростовых факторов в составе питательной среды для культивирования продуцента L-триптофана следует принять кукурузный экстракт.

3. Основным источником азота при биосинтезе L-триптофана культурой *Bac. subtilis* ВНИИгенетика-15 является мочевины.

Возможна частичная замена мочевины на  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  в соотношении 2:3.

4. При изучении морфометрических характеристик процесса показано, что, в результате даже незначительного пребывания при низкой кон-

центрации растворенного кислорода, клетки бактерий *Bac. subtilis* ВНИИ-генетика-15 лизируют, число лизированных клеток в процессе ферментации постепенно увеличивается, достигая к концу процесса 50% и более, при этом скорость биосинтеза L-триптофана снижается.

5. Подобранные модели роста, биосинтеза, потребления РВ и  $O_2$  адекватно описывают указанные процессы.

6. Экспериментальное изучение полупериодического процесса культивирования показало, что

- подачу подпитки при биосинтезе L-триптофана следует проводить по показаниям датчика  $P_{O_2}$  или pH;
- определен состав подпитки;
- нельзя допускать лимитирование по  $O_2$ .

На основании математической модели разработаны условия оптимального проведения полупериодического процесса.

7. Определены условия проведения отъемно-доливного процесса:

- отъем-долив следует осуществлять по показаниям датчика  $P_{O_2}$  или pH;
- оптимальный объем слива культуральной жидкости 85% от исходного объема;
- состав доливной среды готовят с учетом разбавления оставшимся объемом КЖ;
- в течение 10-12 циклов удельные скорости роста и биосинтеза не снижаются;

8. Проведено, с положительными результатами, опытно-промышленное опробование процесса с подпиткой и отъемно-доливного способа культивирования на различных заводах Советского Союза и России.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Музыкаченко Л.А., Альховская Л.Л., Сенаторова В.Н., Русинов В.А. Авторское свидетельство «Способ получения L-триптофана» №1202266, 1984 г.

2. Музыкаченко Л.А., Альховская Л.Л., Сенаторова В.Н. Сравнительный анализ различных способов получения L-триптофана. // Тезисы докл. Всес. конференции «Перспективы создания лекарственных средств с использованием биотехнологии», 1985 г.

3. Музыкаченко Л.А., Альховская Л.Л., Сенаторова В.Н. Изучение влияния условий культивирования на биосинтез L-триптофана. // Тезисы докладов конф. «Управляемое культивирование микроорганизмов», 1986 г.

4. Нестерова И.В., Моносов Э.З., Сенаторова В.Н., Альховская Л.Л., Кантере В.М., Музыкаченко Л.А., Фадеева Е.Ю. Ультраструктурные изменения клеточной стенки *Bac. subtilis*. – продуцента триптофана в динамике роста при периодическом культивировании // Сб. «Материалы У1 научной конференции молодых ученых МТИП. Секция пищевой химии и биохимии, -М., 22-24 окт. 1986 г.»

5. Музыкаченко Л.А., Альховская Л.Л., Сенаторова В.Н. Особенности динамики роста и биосинтеза триптофана культурой *Bac. subtilis*. Тезисы докладов IY Всесоюзной конференции «Аминокислоты для с/х, пищ. пром-сти, медицины и научных исследований», 1988 г.

6. Музыкаченко Л.А., Сенаторова В.Н., Альховская Л.Л., Моносов Э.З., Нестерова И.В., Кантере В.М. Морфометрический анализ развития микроорганизмов. // Биотехнология, - М., 1990 г. №4.

7. Сенаторова В.Н., Музыкаченко Л.А., Альховская Л.Л., Горлова Т.В., Павлова Т.А., Русинов В.А., Сорвихина Е.Ф. Авторское свидетельство «Способ получения L-триптофана № 1822884, 1990г.