

УДК 577.112.388.2.017.22

Г.Е. АВЕТИСОВА, А.А. АМБАРЦУМЯН, Շ.Մ. ԿՈՇԱՐՅԱՆ, Ա.Տ. ՏԱԳԻԱՆ

РАСЧЕТ МАКСИМАЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА ПРОДУКТИВНОСТИ  
И ДРУГИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОЦЕССА БИОСИНТЕЗА ВАЛИНА  
КУЛЬТУРОЙ *BREVIBACTERIUM FLAVUM*

На основе общей схемы биосинтеза валина у микроорганизмов *Brevibacterium flavum* составлены уравнения материально-энергетического баланса для его получения из глюкозы, ацетата и лактата. Из этих уравнений рассчитаны некоторые показатели биосинтеза валина: максимальный коэффициент продуктивности  $Y_p^{\max}$  равен 0,67 при росте на глюкозе, 0,49 – на ацетате и 0,60 – на лактате.

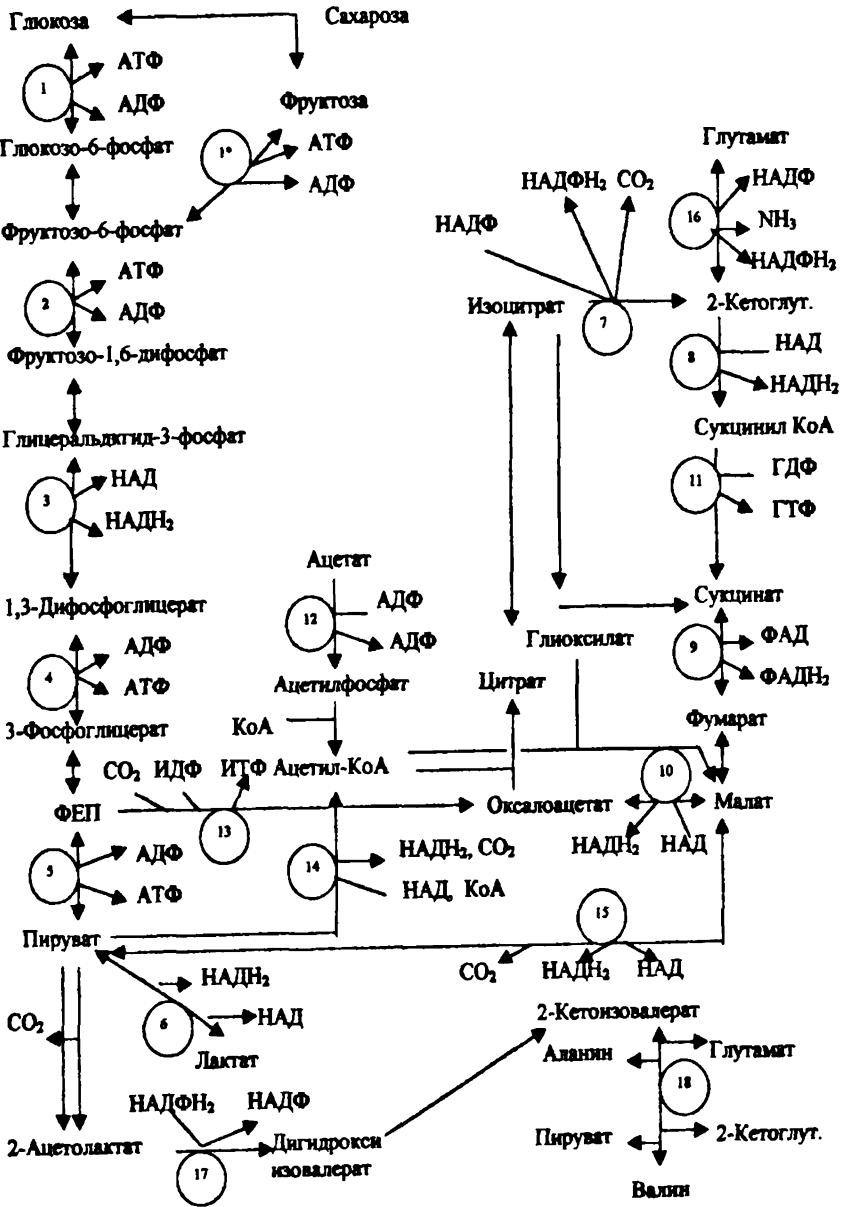
Известно, что сверхсинтез различных метаболитов, в частности аминокислот, у микроорганизмов достигается, в первую очередь, за счет генетических изменений, способствующих направлению функционирования ферментов биосинтеза данного метаболита в нужную исследователю сторону [1, 2]. В то же время существуют ограничения в синтезе продукта из определенного количества субстрата, используемого в качестве источника углерода и энергии, которые зависят от конкретного метаболического пути, ведущего от субстрата к данному продукту. Обычно в клетке для каждой пары субстрат–продукт возможны несколько метаболических путей, различающихся отдельными участками.

Целью настоящей работы было определение максимальных коэффициентов продуктивности и некоторых других характеристик процесса биосинтеза валина из глюкозы, ацетата и лактата у *Brevibacterium flavum*. Выбор микроорганизма *Brevibacterium flavum* обусловлен тем, что лучшие из известных продуцентов валина принадлежат семейству коринебактерий, к которому относится данный вид [3]. Перспективные продуценты L-валина описаны на основе *Brevibacterium flavum* [4, 5].

Для оценки характеристик путей биосинтеза валина использовали методику расчета, аналогичную описанной ранее [6, 7].

На рисунке приведена схема биосинтеза валина из сахарозы, глюкозы, ацетата и лактата клетками *Brevibacterium flavum* [3, 6, 8], откуда следует, что

с энергетической и материальной точки зрения одна молекула сахарозы равнозначна двум молекулам глюкозы. Поэтому в последующем обсуждении сахароза самостоятельно не рассматривается, хотя она является основным источником углерода и энергии при микробиологическом синтезе L-валина и других аминокислот. Что же касается 18-ого энергетического этапа биосинтеза валина, то он является таковым (см. схему) только из-за того, что различные возможные источники аминогрупп (глутамат, аланин) аминируются за счет 16-го истинно энергетического этапа.



Общая схема биосинтеза валина клетками *Brevibacterium flavum*:  
1-18 – энергетические этапы процесса.

Предшественником для биосинтеза валина у *Brevibacterium flavum*, как и у *Escherichia coli* служил пируват [3]. Из двух молекул пировиноградной кислоты образуется одна молекула  $\alpha$ -ацетолактата, из которого в дальнейшем через три известных ферментативных этапа синтезируется L-валин. Сам пируват синтезируется по одному из возможных путей – из глюкозы (А), ацетата (Б) или лактата (В).

А. Глюкоза  $\rightarrow$  2Пируват  $\rightarrow$   $\alpha$ -Ацетолактат  $\rightarrow$  Валин,

Б. 4Ацетат  $\rightarrow$  4Ацетил-КоА  $\rightarrow$  2Малат  $\rightarrow$  2Пируват  $\rightarrow$   $\alpha$ -Ацетолактат  $\rightarrow$  Валин,

В. 2Лактат  $\rightarrow$  2Пируват  $\rightarrow$   $\alpha$ -Ацетолактат  $\rightarrow$  Валин.

Здесь самым сложным является вариант синтеза валина из ацетата, а именно, этап Ацетил-КоА  $\rightarrow$  Малат. Из двух молекул Ацетил-КоА и одной молекулы оксалоацетата с привлечением глиоксилатного шунта [3, 6] образуется одна молекула малата, одна – оксалоацетата (возмещение использованного) и редуцируется по молекуле ФАД и НАД (см. схему). Далее малат превращается в пируват с помощью «малик»-фермента [6].

Синтез пирувата из лактата осуществляется одноэтапно при помощи лактат-дегидрогеназы [6], а из глюкозы – по известному пути Эмбдена-Мейергофа [6, 7].

Для составления полного материально-энергетического баланса рассмотренных путей синтеза валина сделаны следующие допущения [6].

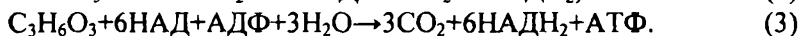
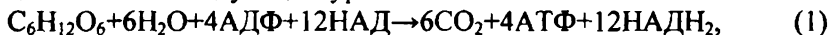
1. Эффективность окислительного фосфорилирования дыхательной цепи Р:О равна 2, что эквивалентно образованию 2 молей АТФ из 1 моля НАДН<sub>2</sub> в результате окислительного фосфорилирования.

2.  $\Delta G^\circ_{\text{НАДН}_2} \sim \Delta G^\circ_{\text{НАДФН}_2} \sim \Delta G^\circ_{\text{ФАДН}_2}$ , где  $\Delta G^\circ$  – свободная энергия окисления,  $\Delta G^\circ_{\text{АТФ}} \sim \Delta G^\circ_{\text{ГТФ}} \sim \Delta G^\circ_{\text{ИТФ}}$ , где  $\Delta G^\circ$  – свободная энергия гидролиза конечной фосфатной группы.

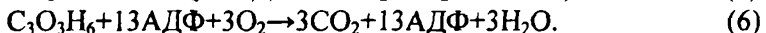
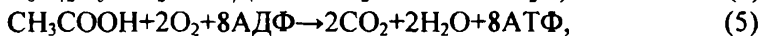
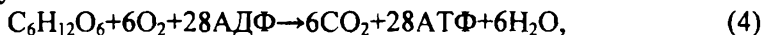
3. При проникновении в клетку 1 моль глюкозы, ацетата или лактата расходуется 1 моль АТФ.

4. Субстрат не расходуется на накопление и поддержание биомассы на определенном уровне.

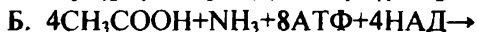
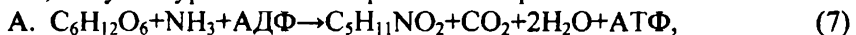
5. Окисление субстратов (глюкозы, ацетата и лактата) и выделение энергии происходит согласно следующим уравнениям:

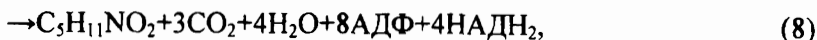


Исключая НАДН<sub>2</sub> из уравнений (1)–(3) в соответствии с допущением 1, получаем следующие:

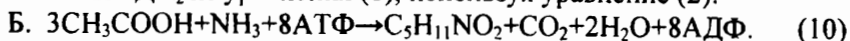


Для каждого из путей синтеза валина можно рассчитать баланс АТФ и НАДН<sub>2</sub>. Основываясь на данных таблицы 1 и стехиометрии превращения субстрата в продукт (А, Б, В), а также на последующем подведении равновесия по элементам, получим уравнения материально-энергетического баланса:





Исключим НАДН<sub>2</sub> из уравнения (8), используя уравнение (2):



Далее, исключим АТФ из уравнений (7), (9), (10) с помощью уравнений (4)–(6):

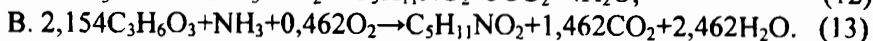
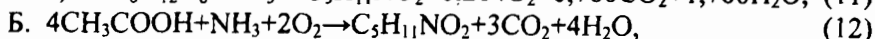
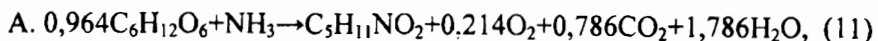


Таблица 1

Энергетический баланс различных путей биосинтеза валина клетками *Br. Flavum*

Номер реакции	Вариант биосинтеза валина		
	А	Б	В
транспорт	- 1	- 4	- 2
1	- 1	0	0
2	- 1	0	0
4	+ 2	0	0
5	+ 2	0	0
12	0	- 4	0
суммарный АТФ	+ 1	- 8	- 2
3	+ 2	0	0
6	0	0	+ 2
9	0	+ 2	0
10	0	+ 2	0
15	0	+ 2	0
16	- 1	- 1	- 1
17	- 1	- 1	- 1
суммарный НАДН <sub>2</sub>	0	+ 4	0

Цифрами обозначено количество молекул энергетического субстрата, образованного (+) или потребленного (-) в процессе реакции.

Исходя из уравнений (7), (9), (10), можем рассчитать расход энергии  $P_{АТФ}$  (моль АТФ / моль валина), а из (11)–(13) – максимальный коэффициент продуктивности по углероду –  $Y_p^{max}$  (г валина / г субстрата), количество синтезированного продукта на 1 моль потребленного кислорода –  $P_{O_2}$  (г валина / моль  $O_2$ ), количество израсходованного субстрата на 1 моль потребленного кислорода –  $C:O$  (моль субстрата / моль  $O_2$ ), количество выделенного тепла на 1 моль синтезированного продукта –  $q_{вал}$  (ккал / моль валина), а также количество выделенного  $CO_2$  на 1 моль потребленного кислорода –  $RQ$  (моль  $CO_2$  / моль  $O_2$ ) (табл. 2).

Из полученных результатов следует, что для синтеза валина глюкоза теоретически является более предпочтительным источником углерода, чем ацетат или лактат, если последние два пути практически выполнимы в данном продуценте. Это выражается в более высоком коэффициенте продуктивности (см. табл. 2). Необходимо также отметить, что синтез АТФ вместо потребления в пути А биосинтеза валина приводит к высвобождению  $O_2$  и пот-

реблению тепла, что практически лишено физического смысла. Из полученных результатов следует также, что по сравнению с ацетатом лактат является более предпочтительным субстратом как с точки зрения конверсии (0,60), так и низкого тепловыделения, расхода кислорода и энергии.

Таблица 2

Показатели различных путей биосинтеза валина клетками *Bv. flavum*

Путь био-синтеза	Субстрат	$Y_p^{\max}$	$R_{ATP}$	$R_{O_2}$	RQ	C : O	$Q_{вал}^{(**)}$
А	глюкоза	0,67	-1 <sup>(*)</sup>	-547,2 <sup>(*)</sup>	-3,67 <sup>(*)</sup>	-1 : 0,22 <sup>(*)</sup>	-22,7 <sup>(*)</sup>
Б	ацетат	0,49	8	58,6	1,5	1 : 0,5	212,0
В	лактат	0,60	2	253,5	3,16	1 : 0,21	49,0

(\*) – отрицательные значения показателей обусловлены тем, что синтез 1 моль валина сопровождается синтезом 1 моль АТФ, исключение которого из уравнения (7) приводит к условному высвобождению  $O_2$  в уравнении материального баланса (11) синтеза валина из глюкозы;

(\*\*) – расчёт  $q_{вал}$  основан на выделении 106 ккал тепла при восстановлении 1 моль  $O_2$  т.е. 26,5 ккал на 1 эквивалент доступных электронов [6].

Вычисленные максимальные коэффициенты продуктивности и другие показатели практически недостижимы, так как при расчете не учитывается расход субстрата на побочные пути метаболизма, а также на накопление биомассы. Следовательно, для максимального приближения показателей биосинтеза к теоретическим значениям необходимо увеличение удельного веса данного пути синтеза целевого продукта среди других метаболических путей клетки, что и происходит в процессе селекции. После того как получены штаммы с показателями, близкими к теоретическим, коэффициент продуктивности перестает служить критерием для селекции. В этом случае дальнейшее усовершенствование штаммов должно быть направлено в сторону увеличения скорости синтеза целевого продукта.

Лучший из описанных в литературе продуцентов валина вида *Brevibacterium flavum* синтезирует 12 г/л L-валина на среде с 100 г/л глюкозы ( $Y_p=0,12$ ) [4], а полученный нами штамм-продуцент L-валина AA53 в аналогичных условиях накапливает 40 г/л L-валина ( $Y_p=0,40$ ) [5]. Следовательно, несмотря на достаточно высокие характеристики штамма *Brevibacterium flavum* AA53, он может быть подвергнут дальнейшему совершенствованию по показателю продуктивности для большего приближения к теоретическому максимуму ( $Y_p^{\max}=0,67$ ).

НИИ Биотехнологии, ЕГУ

Поступила 17.06.2002

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Жданова Н.Н., Гусятинер М.М. Методы селекции и свойства штаммов микроорганизмов-продуцентов аминокислот. Обзор. М. (ВНИИСЭНТИ), 1985, с. 1–64.
2. Umbarger H.E. – Ann. Rev. Biochem., 1978, v. 47, p. 533–606.

3. Biotechnology of amino acids production ed. by Aida K., Chibata I., Nakayama K., Takinami K. and Yamada H., Progress in industrial microbiology, 1986, v. 24, p. 233–246.
4. Ванина С.А., Ивановская Л.В., Леонова Т.В., Жданова Н.И. – Биотехнология, 1993, № 6, с. 2–7.
5. Азизян А.Г., Аветисова Г.Е., Арушанян А.В., Кочарян Ш.М. А.с. (СССР), 1991, №1675327.
6. Shvinka I., Viestures U., Ruklisha M. – Biotechnol. Bioeng., 1980, v. 22, p. 897–912.
7. Амбарцумян А.А., Акопян Э.М., Карапетян Ж.В., Кочарян Ш.М. – Биотехнология, 1986. № 5, с.102–107.
8. Tsuchida T., Momose H. – Agric. Biol. Chem., 1975, v. 39, № 11, p. 2193–2198.

Գ.Ե. ԱՎԵՏԻՍՈՎԱ, Ա.Ա. ՀԱՄԲԱՐԶՈՒՄՅԱՆ, Շ.Մ. ԶՈՉԱՐՅԱՆ, Ա.Ս. ՍԱԴՅԱՆ

*BREVIBACTERIUM FLAVUM* ԲՋԻՋՆԵՐՈՎ ՎԱԼԻՆԻ  
ԿԵՆՍԱՍԻՆԹԵԶԻ ՊՐՈՑԵՍԻ ԱՐՏԱԴՐՈՂԱԿԱՆՆՈՒԹՅԱՆ  
ՍԱՔՍԻՄԱԼ ԳՈՐԾԱԿՑԻ ԵՎ ԱՅԼ ԳՈՐԾԱԿԻՑՆԵՐԻ ՀԱՇՎԱՐԿԸ

Ամփոփում

*Brevibacterium flavum*-ի բջիջներով վալինի կենսասինթեզի պրոցեսի ընդհանուր սխեմայի հիման վրա կազմվել են գլյուկոզից, քացախաթթվից և կաթնաթթվից նրա սինթեզի նյութաէներգետիկ բալանսի հավասարումները: Այդ հավասարումներից հաշվարկվել են վալինի կենսասինթեզի որոշ ցուցանիշներ, մասնավորապես, մաքսիմալ արտադրողականության գործակիցը ( $Y_p^{\max}$ ): Այն գլյուկոզի դեպքում 0,67 է, քացախաթթվի դեպքում՝ 0,49, իսկ կաթնաթթվի դեպքում՝ 0,60:

G.E. AVETISOVA, A.A. HAMBARDZUMYAN, Sh.M. KOCHARYAN, A.S. SAGHYAN

THE CALCULATION OF MAXIMUM PRODUCTIVITY AND OTHER  
COEFFICIENTS FOR VALINE BIOSYNTHESIS BY *BREVIBACTERIUM*  
*FLAVUM*

Summary

On the basis of valine biosynthesis general scheme by *Brevibacterium flavum*, the equations for material and energy balance were worked out in the cases of valine synthesis from glucose, acetate and lactate. Some characteristics of valine biosynthesis were calculated using these equations: the coefficients of maximum productivity were 0.67; 0.49 and 0.60 in the cases of valine biosynthesis from glucose, acetate and lactate, correspondingly.