

УДК 579.66

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОЛИЗИРОВАННОЙ БИОМАССЫ КУЛЬТУРЫ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПРИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ L-ТРЕОНИНА

© 2022 г. А. С. Федоров<sup>1, 2, \*</sup>, Ф. В. Бондаренко<sup>2</sup>,  
А. В. Шутов<sup>1, 2</sup>, Т. В. Выборная<sup>1, 2</sup>, С. П. Синеокий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НИЦ “Курчатовский институт”, Курчатовский геномный центр, Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>Биоресурсный центр “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” Национального исследовательского центра “Курчатовский институт” (БРЦ ВКПМ), Москва, 117545 Россия

\*e-mail: alex.fedorov@genetika.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022 г.

После доработки 18.10.2022 г.

Принята к публикации 22.10.2022 г.

С целью снижения отходов производства кормовой аминокислоты L-треонина изучена возможность использования биомассы продуцента в качестве компонента питательной среды. Для этого биомассу штамма *Escherichia coli* ВКПМ В-13207, остающуюся после выделения L-треонина из культуральной жидкости (КЖ), подвергали автолизу при температуре 42°C. Полученной автолизированной биомассой продуцента (АБП) замещали часть кукурузного экстракта (КЭ), входящего в питательную среду, для проведения процесса биосинтеза аминокислоты в лабораторном ферментере. Показано, что замещение 3/4 КЭ на АБП позволяло проводить микробиологическое получение L-треонина без ухудшения технологических показателей процесса. Концентрация L-треонина в КЖ достигала  $106.9 \pm 0.5$  г/л. Конверсия глюкозы в L-треонин составляла  $45.29 \pm 0.24\%$ . Продемонстрировано проведение нескольких последовательных циклов ферментации L-треонина на средах, приготовленных с использованием биомассы продуцента, являющейся отходом предыдущего цикла.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, автолизат биомассы, кукурузный экстракт, треонин, кормовая аминокислота, ферментер, продуцент

DOI: 10.56304/S0234275822060060

L-треонин, одна из незаменимых аминокислот, является важной кормовой добавкой в животноводстве. В настоящее время в промышленном масштабе треонин производится путем микробиологического синтеза рекомбинантными штаммами-продуцентами, которые экскретируют аминокислоту в культуральную жидкость (КЖ). Согласно ГОСТ Р 57850-2017 [1] форма кормового треонина является кристаллической. При выделении L-треонина КЖ разделяют на надосадочную жидкость и биомассу, которая является отходом производства, подлежащую обезвреживанию и утилизации в канализационных стоках. С другой стороны, бактериальная биомасса богата белком.

В состав питательных сред для выращивания микроорганизмов и биосинтеза L-треонина в ла-

бораторном ферментере включают дрожжевой экстракт [2], который довольно дорог для промышленного использования, и кукурузный экстракт [3, 4], широко применяемый в микробиологической промышленности из-за своей дешевизны. Использование минимальных сред требует добавления отдельных дорогостоящих факторов роста (биотин, аминокислоты) и применение чистого кислорода при барботаже ферментера [5], что является нетехнологичным приемом для промышленного масштаба. Вместе с этим имеется ряд исследований, в которых при биосинтезе биологически активных соединений в качестве компонента питательных сред использовали биомассу бактериальных продуцентов после процесса ферментации, переработанную различными способами. Так, например, ее обрабатывали для продукции L-треонина – путем щелочного и ферментативного гидролиза биомассы [6], для получения L-триптофана – кислотным [7] и ферментативным [8] гидролизом, для получения рибофлавина также ферментативным гидролизом [9]. Однако применение

*Список сокращений:* АБП – автолизированная биомасса продуцента, КЖ – культуральная жидкость, КЭ – кукурузный экстракт, РБК – рабочий банк культуры, с.в. – сухие вещества, *fbr* – feedback resistant (устойчивый к ингибированию по принципу отрицательной обратной связи).

дополнительных реагентов, повышенной температуры и коммерческих ферментов для гидролиза биомассы ведет к повышению себестоимости конечного продукта. Надо также учитывать, что бактерии обладают собственными протеазами, которые при благоприятных условиях способствуют автолизу клеток [10]. В этой связи задача использования биомассы продуцента, представляющей собой отход микробиологического производства аминокислоты, является актуальной и практически значимой.

Целью нашей работы была разработка процесса микробного биосинтеза L-треонина с возможностью замены компонентов питательной среды продуктами отхода этого же производства.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Продуцент L-треонина.** В работе использовали рекомбинантный бактериальный штамм *Escherichia coli* ВКПМ В-13207 из коллекции Национального биоресурсного центра “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” (БРЦ ВКПМ). Штамм В-13207 был получен на основе дикого штамма *Escherichia coli* К-12 (АТСС 47076) в результате проведения нескольких раундов мутагенеза различными мутирующими агентами с целью отбора мутантов наиболее устойчивых к L-треонину, и последующего введения направленных генетических модификаций [11]. Генотип штамма В-13207 –  $\Delta tdh$   $P_{H207}$ -*thrA<sup>br</sup>* *BC-TrmB*  $\Delta lacI$  *supE*  $\Delta poxB$ -*ltaE*  $\Delta sstI$   $\Delta tdc$  *BCDE*  $\Delta ytfG$ - $P_{trc}$ -*pycA*  $P_{LtetO1}$ -*rhtA*.

**Состав сред.** Использовали среды следующего состава, г/л:

а) **ЛА** – агаризованная среда (Лурия): дрожжевой экстракт (тип D, Springer, Франция) – 5, пептон дрожжевой (тип НУР-А, Springer) – 15, NaCl (х.ч., ООО “Химмед Синтез”, Москва) – 5, агар (тип Vacto<sup>TM</sup>, BD, Франция) – 20;

б) **ИСК** – для выращивания инокулята в колбах: дрожжевой экстракт – 35, глюкоза моногидрат (пищевая, фирма Roquette, Франция) – 3.6,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  (пищевой, ООО “Химмед Синтез”) – 3.3, NaCl – 2.5;

в) **ПСФ** – для выращивания посевной культуры в ферментере: экстракт кукурузного зерна (уваренный, ООО “АМИЛКО”, Миллерово) – 25,  $KH_2PO_4$  (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) – 2,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) – 0.8,  $(NH_4)_2SO_4$  (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) – 1,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) – 0.02,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) – 0.02, глюкоза моногидрат (пищевая, фирма Roquette, Франция) – 65, пеногаситель (марка ARCOL

POLYOL 1104, Covestro International SA, Швейцария) – 1;

г) **ОСФ** – для проведения основного процесса биосинтеза: экстракт кукурузного зерна – 15,  $KH_2PO_4$  – 2.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 1.5,  $(NH_4)_2SO_4$  – 0.5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.02,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  – 0.02, глюкоза моногидрат – 15, пеногаситель – 2.

pH всех сред до стерилизации – естественный. В экспериментах с применением автолизатов биомассы продуцента (АБП) кукурузный экстракт заменяли частично или полностью (количество указано в описаниях экспериментов). Глюкозу моногидрат вносили асептически в ПСФ и ОСФ после стерилизации сред в виде стерильного запасающего раствора с концентрацией 770 г/л.

Подпитку углеводным субстратом в ходе основного процесса биосинтеза осуществляли 51.9 ± 0.2%-ным (масс.) раствором глюкозы. Все среды, подпиточный и запасной растворы стерилизовали автоклавированием при 1.0 атм в течение 30 мин. Поддержание pH среды в ходе выращивания посевной культуры и проведения основного процесса биосинтеза осуществляли 25%-ным (мас.) водным аммиаком (о.с.ч., ООО “Химмед Синтез”).

**Подготовка рабочего банка культуры (РБК).**

Культуру клеток выращивали на чашках со средой ЛА течение 24 ч при 37°C. Из биомассы, выросшей на чашках, готовили клеточную суспензию в дистиллированной воде. В качалочные колбы объемом 750 мл с 15 мл среды ИСК вносили суспензию клеток до получения ОП<sub>660</sub> 0.1 ед. Колбы инкубировали на качалке при скорости 220 об./мин и температуре 37°C до достижения ОП<sub>660</sub> 5–6 ед. В полученную культуру вносили стерильный раствор глицерина с концентрацией 500 г/л до его конечной концентрации 150 г/л. Аликвоты РБК штамма-продуцента объемом 1.0 мл хранили при –70°C.

**Подготовка инокулята.** В качалочные колбы объемом 750 мл с 15 мл среды ИСК вносили суспензию клеток из РБК до получения ОП<sub>660</sub> 0.1 ед. Колбы инкубировали на качалке при скорости 220 об./мин и температуре 37°C до достижения ОП<sub>660</sub> 5–6 ед.

**Подготовка посевной культуры.** Выращивание посевной культуры проводили в 3 л ферментере КФ-103/4 (ООО-фирма “Проинтех”, Пушкино), оснащенном контроллером Merabit (“КЕКЛАВ”, Москва-Пушино), системой термостатирования, перистальтическими насосами для титрования, а также датчиками контроля pH- и pO<sub>2</sub>. Культивирование осуществляли на среде ПСФ с автоматическим поддержанием pH 6.9. Рабочий объем КЖ составлял 1.0 л; инокуляцию проводили до получения ОП<sub>660</sub> 0.002 ед. Культивирование проводили при перемешивании со скоростью 700 об./мин,

поддерживая температуру на уровне 39°C. Аэрацию проводили стерильным воздухом из расчета 1.0 л/л/мин. Культивирование проводили до достижения ОП<sub>660</sub> 25 ед.

**Проведение основного процесса биосинтеза L-треонина.** Биосинтез целевой аминокислоты проводили в 3 л ферментерах КФ-103/4 с начальным рабочим объемом КЖ 1.0 л. на среде ОСФ с автоматическим поддержанием pH 6.9. Доля посевной культуры составляла 8–9%. Аэрацию осуществляли стерильным воздухом из расчета 1.0 л/л/мин в начале процесса с последующим увеличением на 24 час роста до 4.0 л/л/мин. Минимальная скорость перемешивания составляла 500 об./мин. В ферментационной среде поддерживали концентрацию растворенного кислорода на уровне 20% от насыщения воздухом путем каскадной регулировки скорости мешалки до 1100 об./мин, температуру культивирования – на уровне 33°C. По исчерпанию исходной глюкозы в среде ОСФ, которое определяли по резкому скачку показаний рО<sub>2</sub>-датчика, начинали подпитку глюкозой, подавая ее со скоростью 3.47 г/(ч · л нач. объема), далее непрерывно увеличивая скорость до 13.8 г/(ч · л нач. объема) в течение 14 ч. Этот уровень скорости подачи поддерживали до окончания процесса. Культивирование продолжали в течение 36 ч. Эксперименты проводились в трех независимых повторностях.

**Приготовление АБП.** Культуральную жидкость из ферментера центрифугировали в течение 10 мин при 2100 g. Надосадочную жидкость сливали, а биомассу промывали, ресуспендировав в эквивалентном объеме дистиллированной воды. Центрифугирование повторяли и определяли массу полученной влажной биомассы. К биомассе прибавляли эквивалентное по массе количество дистиллированной воды, ресуспендировали и помещали в термостат при 42°C на 48 ч. Образцы приготавливали в трех независимых повторностях.

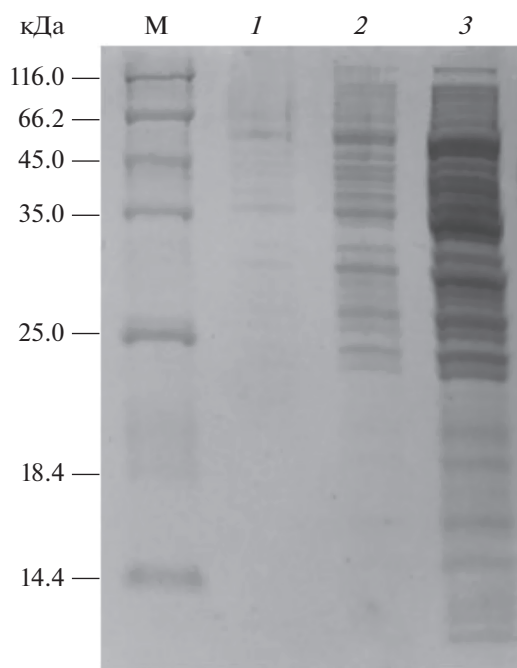
**Определение состава АБП методом SDS-PAGE.** Разделение белков в денатурирующих условиях проводили, как описано ранее [12]. Нерастворенные вещества в пробах автолизата осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 14 100 g, затем отбирали 10 мкл надосадочной жидкости и последовательно разводили дистиллированной водой в 10, 20 и 100 раз. Из каждого полученного раствора отбирали 10 мкл и смешивали с 2.5 мкл 5-кратного буфера следующего состава: 62 мМ трис гидрохлорид (Amresco, США), 10% глицерин (ч.д.а. ООО “Химмед Синтез”), 1% додецилсульфат натрия (Applichem, Германия), 5% бета-меркаптоэтанол (Merck, США), 0.05% бромфеноловый синий (ч.д.а., “Реахим”, СССР). Полученные образцы кипятили в течение 5 мин при 95 °С, затем их наносили в лунки геля, содержащего 12%

полиакриламида (Sigma-Aldrich, США). Электрофорез проводили при напряжении 60–100 В в разделяющем трис-глициновом буфере с pH 8.3 (25 мМ Трис (Serva, Германия), 192 мМ глицин (Sigma-Aldrich), 0.1% додецилсульфат натрия)). По окончании процесса белки окрашивали водным раствором Кумасси R250 (0.13% Кумасси R250 (Amresco, США), 45% этанол (ч.д.а., ООО “Константа-Фарм М”), 9% уксусная кислота (х.ч., ООО “Химмед Синтез”). В качестве маркера молекулярного веса использовали Unstained Protein Molecular Weight Marker (ThermoFisher Scientific, США), содержащий белки следующих масс 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 и 14.4 кДа.

**Аналитические методы.** Уровень концентрации глюкозы определяли с помощью системы BIOSEN C-Line (модель Clinic/GP+, EKF-diagnostic GmbH, Германия), используя ферментный чип-сенсор Глюкоза II типа. Содержание сухих веществ измеряли с использованием анализатора влагосодержания OHAUS (модель M120, OHAUS Corp., США). Количество общего азота в компонентах питательных сред проводили по методу Кьельдаля с использованием автоматического дистиллятора KjellFlex (модель K-360, BUCHI, Швейцария) в комплекте с титратором Titrimo (модель Plus, Methorm, Швейцария). Пробы сжигали в дигестре SpeedDigerster (модель K-425, BUCHI) в комплекте со скруббером TripleScrub (модель K-415, BUCHI) в концентрированной серной кислоте (х.ч., ООО “Химмед Синтез”) при 550°C в течение 60 мин. Динамику накопления L-треонина в КЖ наблюдали, измеряя содержание аминокислоты методом ИК-Фурье спектроскопии (модель спектрометра Invenio S, Bruker, Германия) по калибровочной кривой, построенной с использованием КЖ, содержащей растворы треонина с валидированными методом ВЭЖХ концентрациями. По окончании процесса для точного расчета конверсии глюкозы в целевой продукт количество накопленного в среде L-треонина определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Alliance (WATERS, США) с рефрактометрическим детектором (модель 2414, WATERS) и колонкой YMC-Pack Polyamine II 250 × 4.6 mm, 5 μm, 12 nm (YMC CO., LTD., Япония). Температуру колонки поддерживали на уровне 50°C. Элюентом служила смесь ацетонитрил : этилацетат : Н<sub>2</sub>О = 46 : 4 : 50, подаваемая со скоростью 2.0 мл/мин. В качестве стандарта аминокислоты использовали L-треонин (кат. № T8625, Sigma-Aldrich, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования белкового состава АБП, полученной при 42°C, проводили анализ методом



**Рис. 1.** SDS-PAGE электрофореграмма полученного при 42°C АБП. М – маркеры молекулярного веса; 1, 2, 3 – образцы АБП, нанесенные в объеме 0.1, 0.5, 1.0 мкл соответственно.

**Fig. 1.** SDS-PAGE of ABSP obtained at 42°C. M—molecular weight markers; 1, 2, 3—ABSP samples of 0.1, 0.5, and 1.0 μL, correspondently.

#### SDS-PAGE, как это описано в разделе УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА.

При нанесении на гель раствора АБП объемом 0.1 и 0.5 мкл (рис. 1 дорожки 1 и 2 соответственно) четких выводов о белковом составе автолизата сделать трудно. При нанесении 1.0 мкл образца АБП (дорожка 3) распределение белков было наиболее отчетливым; основная фракция состоит из белков с молекулярной массой 25–66.2 кДа, имеются небольшие фракции с массой до 116 кДа и 20–14.4 кДа, а также небольшое количество мелких фрагментов массой ниже 14.4 кДа.

Поскольку *E. coli* содержит несколько протеаз и пептидаз и способна транспортировать и утилизировать пептиды как источник аминокислот [10], можно предположить, что при приготовлении АБП происходит деградация части внутри-

клеточных белков. Это позволяет использовать АБП в качестве источника азота, пригодного для питательных сред при культивировании микроорганизмов, и, в частности, для микробиологического получения кормового L-треонина.

Для оценки технологической пригодности полученной АБП в ней были измерены содержание сухих веществ (%) и содержание азота (%) по методу Кьельдаля (см. раздел УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА) в сравнении с кукурузным экстрактом (КЭ). Полученные результаты представлены в табл. 1.

В дальнейшем в зависимости от эксперимента с целью замещения КЭ в питательной среде АБП вносилась эквивалентно из расчета содержания сухих веществ или содержания азота.

При изучении влияния на конверсию глюкозы в L-треонин при культивировании в среде ОСФ КЭ заменяли на АБП на 50, 75 и 100% (в пересчете на сухие вещества).

Результаты экспериментов проведения основного процесса биосинтеза L-треонина представлены на рис. 2. Снижение содержания КЭ в 2 и 4 раза относительно стандартного (15.0 г/л) с заменой недостающего количества эквивалентным по сухим веществам АБП приводило к некоторому увеличению конверсии глюкозы в L-треонин. Причем замены 50 и 75% КЭ приводили к близким значениям этого технологического показателя ( $46.77 \pm 0.73$  и  $46.16 \pm 0.11\%$  соответственно). Полная замена КЭ на АБП не ухудшала конверсию ( $44.40 \pm 0.04$  против  $43.41 \pm 2.37\%$  в контроле), но она была ниже, чем в случае замены 75% КЭ. Поэтому в дальнейшем, с целью максимальной замены КЭ и получения наилучшей конверсии глюкозы в L-треонин было решено применять питательную среду с 1/4 КЭ и 3/4 АБП. Следует отметить, что ростовые характеристики штамма (скорость роста, максимальная оптическая плотность культуры) на модифицированных питательных средах не отличались от таковых для контрольной среды (данные не приведены).

Для оценки эффективности источников азота ферментацию с получением L-треонина провели в лабораторном ферментере на среде ОСФ, содержащей 100, 25% КЭ и без него с одновременной заменой недостающей части азота КЭ на эквива-

**Таблица 1.** Содержание азота и сухих веществ в используемых источниках азота

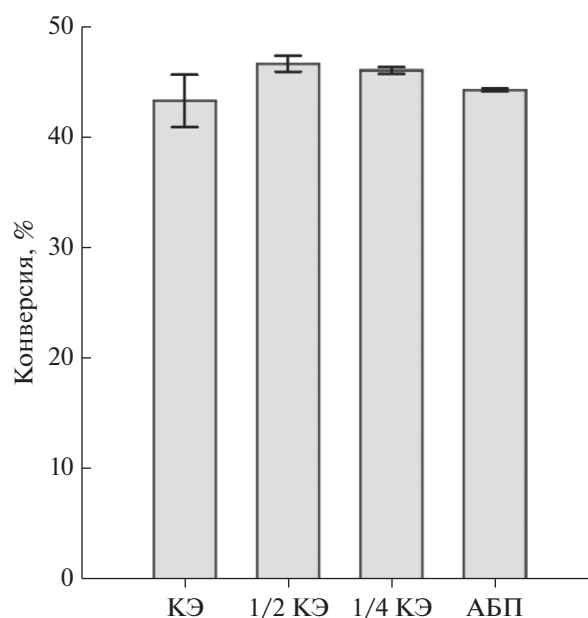
**Table 1.** Nitrogen and dry matter content in components for medium preparation used in this work

Сырье	Содержание азота, %	Содержание сухих веществ, %
Кукурузный экстракт	$2.77 \pm 0.31$	$47.0 \pm 0.5$
АБП	$1.68 \pm 0.28$	$14.8 \pm 0.3$

лентное количество азота АБП. Исходя из измеренных величин количества азота в этих компонентах (см. табл. 1), в приготовленной таким образом питательной среде ОСФ содержится 0,0, 18,8 и 25,0 г/л АБП соответственно. Как следует из результатов экспериментов, представленных в табл. 2, замена в питательной среде КЭ на 3/4 АБП по азотному эквиваленту (строка 2) приводила к незначительному (на 2,95 г/л) снижению концентрации треонина в КЖ и к некоторому увеличению (примерно на 2%) конверсии глюкозы в L-треонин. Полная замена КЭ на АБП по азотному эквиваленту (строка 3) в большей степени приводила к снижению концентрации треонина в среде (на 5,85 г/л) и практически не влияла на конверсию.

Чтобы продемонстрировать возможность осуществления следующего цикла ферментации на среде ОСФ, содержащей переработанную биомассу продуцента, полученную после предыдущего цикла биосинтеза L-треонина на среде ОСФ, содержащей 1/4 КЭ и АБП, готовили АБП-2 по методике приготовления АБП (см. разд. УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА). Согласно анализу АБП-2 содержание азота в ней составило  $2.09 \pm 0.38\%$  (мас.). Соответственно, следующий цикл ферментации проводили на среде ОСФ, содержащей 1/4 КЭ и 15,1 г/л АБП-2. Результаты этого эксперимента также приведены в табл. 2 (строка 4). Оба цикла ферментаций на средах, содержащих переработанную биомассу имеют довольно близкие значения показателей биосинтеза (строки 2 и 4), что свидетельствует о принципиальной возможности многократной рециклизации биомассы, являющейся отходом микробиологического синтеза L-треонина.

Использование биомассы продуцента, переработанной для последующей ферментации, не является новым подходом. Однако в типичных случаях подготовка отработанной после ферментации биомассы продуцента с возвратом полученного переработанного продукта на последующую ферментацию предусматривает реагентную обработку или использование ряда технологических при-



**Рис. 2.** Влияние замены КЭ на АБП в питательной среде на конверсию глюкозы в L-треонин при микробиологическом получении аминокислоты штаммом *E. coli* ВКПМ В-13207 в лабораторном ферментере. КЭ – контроль (15 г/л КЭ ~ 7,05 г с.в.), 1/2 КЭ – 7,5 г/л КЭ + 23,9 г/л АБП (в эквиваленте по с.в.), 1/4 КЭ – 3,75 г/л КЭ + 35,7 г/л АБП (в эквиваленте по с.в.), АБП – 47,6 г/л (~7,05 г с.в.).

**Fig. 2.** Effect of CSL replacement with APB in media on the conversion of dextrose to L-threonine in the microbiological production of the aminoacid by *E. coli* strain VKPM B-13207 in a benchtop fermenter. CSL – control (15 g/L CSL ~ 7.05 g d.w.), 1/2 CSL – 7.5 g/L CSL + 23.9 g/L ABSP (d.w. equivalent), 1/4 CSL – 3.75 g/L CSL + 35.7 g/L ABSP (d.w. equivalent), ABSP – 47.6 g/L (7.05 g d.w.).

емов. К ним относятся использование высокого давления для разрушения клеток микроорганизмов с последующей обработкой коммерческими протеазами [6], использование кислотного гидролиза в сочетании с коммерческими ферментными препаратами [7] или только обработка ферментными препаратами [8, 13], при этом выход целе-

**Таблица 2.** Показатели биосинтеза L-треонина штаммом *E. coli* ВКПМ В-13207 в лабораторном ферментере на среде ОСФ при различных соотношениях КЭ и АБП (в эквиваленте по азоту)

**Table 2.** L-threonine biosynthesis results by *E. coli* strain VKPM B-13207 in a bench scale fermenter on media with different content of CSL and ABSP

№ п/п	Среда	Концентрация треонина, г/л	Конверсия, %
1	Контроль (15 г/л КЭ ~ 0,42 г азота)	$109.85 \pm 0.85$	$43.41 \pm 2.37$
2	1/4 КЭ + АБП (18,8 г/л в эквиваленте по азоту)	$106.90 \pm 0.50$	$45.29 \pm 0.24$
3	АБП (25 г/л ~ 0,42 г азота)	$104.00 \pm 0.40$	$43.90 \pm 0.60$
4	1/4 КЭ + АБП-2 (15,1 г/л в эквиваленте по азоту)	$107.80 \pm 1.35$	$45.28 \pm 0.41$

вого продукта не всегда достигал прежнего уровня [13]. В предложенном нами способе подготовки биомассы продуцента для ее использования в качестве альтернативы КЭ не требуется обработка ферментными препаратами и кислотами или использование повышенного давления и температуры, что важно с точки зрения снижения затрат на получение целевого продукта.

Таким образом, нами показана возможность полной или частичной замены кукурузного экстракта как источника азота и ростовых факторов при микробиологическом синтезе L-треонина рекомбинантным штаммом-продуцентом на автолизированную биомассу продуцента, полученную на предыдущих циклах ферментации. При этом предпочтительным вариантом питательной среды в указанных условиях является использование 1/4 от исходного содержания КЭ (3.75 г/л) и АБП в количестве, эквивалентном содержанию сухих веществ или азота в данных источниках. Применение модифицированной среды предоставляет возможность рециклизации биомассы продуцента, являющейся отходом традиционного микробиологического производства аминокислоты с сохранением основных технологических показателей биосинтеза целевого продукта. Это не только уменьшает его стоимость за счет снижения затрат на источники азота и ростовых факторов для питательной среды, но и не требует утилизации отходов при промышленном получении L-треонина.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при государственной финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1659 и Государственного задания АААА-А20-120093090016-9 с частичным привлечением оборудования Национального биоресурсного центра “Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов” (БРЦ ВКПМ).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику БРЦ ВКПМ, к.б.н. Воюшину К.Е. за помощь при проведении анализа автолизата методом SDS-PAGE.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ГОСТ Р 57850-2017. Треонин кормовой. Технические условия: национальный стандарт Российской Федерации: издание официальное: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 октября 2017 г. No 1545-ст: введен впервые: дата введения 2019-01-01 / разработан Акционерным обществом “Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности” (АО “ВНИИКП”). – Москва, Стандартинформ, 2017. – 11 с.
- Liu S., Liang Y., Liu Q., Tao T., Lai S., Chen N., Wen T. Development of a two-stage feeding strategy based on the kind and level of feeding nutrients for improving fed-batch production of L-threonine by *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(2), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4317-4>
- Okamoto K., Ikeda M. Development of an industrially stable process for L-threonine fermentation by an L-methionine-auxotrophic mutant of *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.*, 2000, 89(1), 87–89. [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(00\)88057-3](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(00)88057-3)
- Su Y., Guo Q.Q., Wang S., Zhang X., Wang J. Effects of betaine supplementation on L-threonine fed-batch fermentation by *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2018, 41(10), 1509–1518. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1978-0>
- Lee M.H., Lee H.W., Park J.H., Ahn J.O., Jung J.K., Hwang Y.I. Improved L-threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions. *J. Biosci. Bioeng.* 2006, 101(2), 127–130. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.127>
- Blaesen M., Friehs K., Flaschel E. Recycling of bacterial biomass in a process of L-threonine production by means of a recombinant strain of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 2007, 132(4), 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.08.011>
- Xu Q., Bai F., Chen N., Bai G. Utilization of acid hydrolysate of recovered bacterial cell as a novel organic nitrogen source for L-tryptophan fermentation. *Bioengineered*, 2019, 10(1), 23–32. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1586053>
- Xu D., Zhang Zh., Liu Z., Xu Q. Using enzymatic hydrolyzate as new nitrogen source for L-tryptophan fermentation by *E.coli*. *Bioengineered*, 2020, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1700092>
- Bretz K., Ilijevic S., Gruneberg M., Becker U., Syldatk Ch. Biomass recycling from a riboflavin cultivation with *B. subtilis*: lysis, extract production and testing as substrate in riboflavin cultivation. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 95(6), 1023–1031. <https://doi.org/10.1002/bit.21009>
- Miller C.G. Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1975, 29(1), 485–504.
- Выборная Т.В., Бубнов Д.М., Хозов А.А., Юзбаев Т.В., Федоров А.С., Мокрова С.С., Кудима М.Д., Синюкий С.П. Штамм *Escherichia coli* с инактивированным геном *ttdT* – продуцент L-треонина. Патент RU 2731282, опублик. 01.09.2020 бюлл. № 25
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Баранова И.П., Егоров Н.С., Головкина Г.П., Григорян А.Н. Применение ферментных гидролизатов биомассы микроорганизмов в средах для культивирования *Str. lactis*, продуцента низина. *Антибиотики*, 1980, 25(10), 735–738.

## The Utilization of Autolyzed Biomass of the Producer Strain in the L-threonine Microbiological Synthesis

A. S. Fedorov<sup>a, b, #</sup>, F. V. Bondarenko<sup>b</sup>, A. V. Shutov<sup>a, b</sup>, T. V. Vybornaya<sup>a, b</sup>, and S. P. Sineoky<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Kurchatov Genomic Center, National Research Center “Kurchatov Institute” (NRCKI), Moscow, 123098 Russia

<sup>b</sup>Bio-Resource Center “Russian Collection of Industrial Microorganisms” (BRC VKPM),  
National Research Center “Kurchatov Institute” (NRCKI), Moscow, 117545 Russia

<sup>#</sup>e-mail: alex.fedorov@genetika.ru

**Abstract**—In order to reduce waste in the production of feed aminoacid *L*-threonine, a possibility of using the biomass of the producer as a component of the fermentation medium has been studied. For this purpose, the biomass of *Escherichia coli* strain VKPM B-13207, which remained after the separation of *L*-threonine from the fermentation broth (FB), was subjected to autolysis at a temperature of 42°C. Then, part of the corn steep liquor (CSL), a component of the medium for the amino acid biosynthesis in a benchtop fermenter, was replaced with autolyzed biomass of the producer strain (ABPS). It was shown that the replacement of 3/4 of CSL with ABSP did not lead to a deterioration of technological parameters of the process of *L*-threonine microbiological production. The concentration of *L*-threonine in FB was  $106.9 \pm 0.5$  g/L; the conversion of glucose to *L*-threonine was  $45.29 \pm 0.24\%$ . Several consecutive cycles of *L*-threonine fermentation were shown to be carried out on media containing the producer biomass obtained as waste from the previous fermentation cycle.

**Keywords:** *Escherichia coli*, biomass autolysate, corn steep liquor, threonine, feed aminoacid, fermenter, producer