

МУТАНТНІ ШТАМИ МІКРООРГАНІЗМІВ — ПРОДУЦЕНТІВ ЛІЗИНУ ТА ТРЕОНІНУ

Г. С. Андріяш
Г. М. Заболотна
С. М. Шульга

ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки
НАН України», Київ

E-mail: Shulga5@i.ua

Отримано 23.01.2014

Проведено дослідження штамів мікроорганізмів — продуцентів незамінних амінокислот аспартавної родини: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України» за біосинтетичною активністю щодо лізину і треоніну. Після УФ-опромінення було одержано активні штами-продуценти цільових амінокислот, вивчено біологічні особливості цих мікроорганізмів і визначено їхню біосинтетичну ефективність.

За допомогою аналізу регуляторної та аналогорезистентної ауксотрофності вибрано нові мутантні штами-продуценти треоніну і лізину. Досліджено чутливість вихідних і мутантних штамів-продуцентів до пеніцилінів, макролідів, цефалоспоринових, тетрациклінів та інших груп антибіотиків. Визначено біосинтетичну активність продуцентів треоніну — *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 та лізину — *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 щодо продукування цільових амінокислот. Штами депоновано в «Національній депозитарії мікроорганізмів» Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Ключові слова: продукування лізину та треоніну, мутантні штами-продуценти.

Дедалі зростаючий попит на незамінні амінокислоти потребує від біотехнологічної промисловості постійного вдосконалення виробництва, впровадження нових ефективних технологій і обладнання. Цього можна досягти шляхом здешевлення субстратів або застосування нових ефективних штамів-продуцентів з підвищеним рівнем продукції амінокислот [1, 2].

Оскільки L-лізін та L-треонін одержують переважно мікробіологічним способом, то інтенсифікація процесу виробництва за рахунок підвищення синтезу цільових продуктів більш активними штамми мікроорганізмів не потребуватиме значних капіталовкладень в обладнання [3–5].

Це зумовлює актуальність та економічну доцільність пошуку нових активних штамів-продуцентів лізину і треоніну, дослідження їхніх біологічних властивостей, механізмів адаптації до засвоєння субстратів та можливості використання ефективних мікроорганізмів для біотехнології незамінних амінокислот.

Надати необхідних властивостей продуцентам можна, змінюючи геном бактерій за допомогою мутагенезу (включаючи методи

генної інженерії) або селекцією [1, 6, 7]. Після цього потрібно перевірити життєздатність, біосинтетичну активність і стабільність одержаних за культивування штамів-продуцентів.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами-продуценти незамінних амінокислот: *Brevibacterium* sp. 90 H, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. E 531, *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum* 3144 B-832-10 із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки» НАН України.

Умови культивування та середовища. Для вирощування штамів-продуцентів використовували повноцінні живильні середовища (ПЖС) такого складу: м'ясо-пептонний агар (МПА) (г/дм³): поживний бульйон — 23,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0 ± 0,1 та м'ясо-пептонний агар збагачений (МПАзб) (г/дм³): поживний бульйон — 23,0, глюкоза — 1,0, дріжджовий екстракт — 5,0, агар — 30,0, вода дистильована, рН 7,0 ± 0,1 [8].

Для одержання окремих колоній відбирали $0,2 \cdot 10^{-3}$ дм³ та $1,0 \cdot 10^{-3}$ дм³ культуральної рідини вихідних і мутантних штамів з розведень 10^{-6} та 10^{-7} , відповідно, переносили в чашки Петрі й заливали охолодженим до температури 45 ± 3 °С МПАзб. Інкубацію здійснювали в термостаті за температури 31 ± 1 °С упродовж трьох діб. Усі колонії, які вирости на МПАзб, було взято для визначення біосинтезу лізину. Найбільш продуктивні клони відбирали для подальших досліджень. Клон пересівали один раз на квартал і зберігали на МПАзб за температури $+4$ °С [8].

Перевірку на чистоту культури та продуктивність проводили один раз на рік (музейні культури).

Для визначення ауксотрофності штамів та проведення мутагенезу брали бактеріальну суспензію, яку готували таким чином: відбирали дводобову культуру зі штрихових культур МПАзб, яку розводили у стерильному фізіологічному розчині до концентрації $1 \cdot 10^5$ колонієутворювальних одиниць — КУО/дм³, що відповідало 0,5 оптичної густини (ОГ). ОГ вимірювали в кюветах з $d = 5,0$ мм за довжини хвилі 440 нм за допомогою фотоелектроколориметра (модель КФК-3).

Одержаний інокулят переносили стерильно в: а) повноцінне середовище (МПАзб.); б) мінімальне середовище (МС) [глюкоза або сахароза — 3,0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1,0%, K_2HPO_4 — 0,2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,04%]; в) МС із досліджуваною амінокислотою (МС + лейцин або гомосерин) та досліджуваним антиметаболітом [МС + аміноетилцистеїн (АЕЦ) або β -оксинорвалін (НВ)]; г) мелясне середовище. Склад мелясного середовища (г/дм³): м'яса — 160,0; кукурудзяний екстракт — 40,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 15,0; KH_2PO_4 — 0,5; K_2HPO_4 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,25; біотин — $3,0 \cdot 10^{-4}$; лейцин — $2,0 \cdot 10^{-4}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ — 0,01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; CuSO_4 — 0,2; NiCl_2 — 0,02.

Після стерилізації вносили стерильну крейду в кількості 10 г/дм³ для створення буферності середовища в процесі метаболізму бактерій. Глибинне культивування здійснювали в колбах Ерленмейера 0,25 дм³ з живильним середовищем об'ємом 0,03 дм³ за температури 31 ± 1 °С при 240 об/хв в шейкері-інкубаторі BIOSAN ES-20 (Латвія) протягом трьох діб.

Процес культивування контролювали безпосередньо за допомогою мікроскопії живих препаратів та біохімічних аналізів культуральної рідини (КР).

Ріст штамів-продуцентів лізину оцінювали візуально за наявністю росту й утворен-

ням пігменту (тверді живильні середовища); на рідких середовищах — вимірюванням концентрації клітин у культуральній рідині за ОГ; зміною рН середовища — за допомогою цифрового рН-метра (рН-метр 150), використанням цукрів — резорциновим методом [9]. Кількість синтезованих цільових амінокислот визначали за допомогою амінокислотного аналізатора ААА 400 (Чехія) [10].

Дослідження ауксотрофності та чутливості до антибіотиків здійснювали згідно з методиками [6, 11], модифікованими для бактеріальних продуцентів. Як повноцінне живильне середовище і позитивний контроль використовували МПАзб, як негативний — МС. Глюкозу, сахарозу та амінокислоти стерилізували окремо і вносили в МС. Розчини амінокислот (наважка амінокислоти масою 0,19 г в 0,025 дм³ дистильованої води) стерилізували протягом 15 хв за тиску 49 кПа. Стерильні розчини амінокислот об'ємом 0,004 дм³ вносили в розплавлене МС (0,05 дм³), перемішували та розподіляли на чашки Петрі. Інкубацію проводили за температури 31 ± 1 °С упродовж 2–3 діб.

Реактиви. У роботі застосовували аналоги лізину — S-(2-aminoethyl)-L-cysteine і треоніну — β -оксинорвалін (Sigma, США), набори незамінних амінокислот (Китай) та дисків з антибіотиками (Україна).

Згідно з методикою [12] проведено мутагенез опроміненням бактеріальних суспензій за кімнатної температури протягом 60–720 с на установці, що складалася з двох ламп Philips потужністю 30 Вт кожна ($\lambda = 254$ нм, відстань до об'єкта опромінення — 0,12 м).

Опромінену бактеріальну суспензію розсівали на чашки Петрі у різних розведеннях (від початкової концентрації суспензії до 10^{-6}) на мінімальне середовище з амінокислотами та аналогами цільових амінокислот [11].

Інкубацію здійснювали в термостаті за температури 31 ± 1 °С протягом трьох діб. Усі колонії, які вирости на МС з амінокислотами та на МС з аналогами амінокислот, що були ауксотрофними до лейцину та гомосерину, перевірено щодо продукування амінокислот. Найпродуктивніші клони відбирали для наступних етапів опромінювання та подальших досліджень.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel. Усі досліди проводили в 3 повторах. Різницю між двома середніми величинами вважали вірогідною за $P < 0,05$ (позначено *).

Визначення життєздатності штамів-продуцентів під дією УФ-опромінення. Згідно з [6, 7] мутації в бактеріальній клітин-

ні продуцентів біологічно активних сполук можуть бути як позитивними, так і негативними.

Один із шляхів одержання продуцентів лізину та треоніну — селекція регуляторних мутантів, у яких гомосериндегідрогеназа нечутлива до треоніну. Селективними агентами слугували аналоги треоніну β -оксинорвалін і лізину S-(2-aminoethyl)-L-cysteine. Мутанти, стійкі до НВ та АЕЦ, мали дві регуляторні мутації, що порушували ретроінгібування як гомосериндегідрогенази, так і аспартаткінази. У таких штамів у середовище одночасно виділялися треонін і лізин [13].

У популяції мікроорганізмів після УФ-опромінення з рівним ступенем імовірності могли з'явитися як мутанти, так і ревертанти. Тому важливо після опромінення штамів-продуцентів лізину виявити штам з підвищеним синтезом лізину, а серед мутантів-ревертантів також і продуценти з підвищеним синтезом треоніну. «Повернення» мутантів (опромінені продуценти лізину) до «диких» штамів може змінити регулювання синтезу амінокислот. Використання аналогової резистентності як генетичного маркера дало змогу вибрати найбільш продуктивні штам за цільовими амінокислотами [6, 13].

Аналоги лізину S-(2-aminoethyl)-L-cysteine та треоніну β -оксинорвалін діяли як ретроінгібітори чи корепресори синтезу природних метаболітів, проте вони не могли

замінити їх функціонально. Тому на мінімальному середовищі з антиметаболітом виживали та утворювалися колонії лише тих клітин, у яких порушений механізм негативної регуляції біосинтезу амінокислоти і які, унаслідок цього порушення, синтезували надлишок цільової амінокислоти [11]. Мутагенез здійснювали згідно зі схемою, що її подано на рис. 1.

Результати та обговорення

На першому етапі дослідження було визначено вплив мутагенних факторів на життєздатність клітин бактерій. Як контроль брали відповідні розведення неопроміненої суспензії бактерій. Життєздатність клітин встановлювали до та після УФ-опромінення бактеріальної суспензії. Кількість клітин у популяції, що виживали, визначали за кількістю утворених колоній на МПАзб. і залежно від тривалості дії УФ-фактора. Контролем слугувала неопромінена бактеріальна суспензія.

За даними [6, 12], імовірність мутацій у бактеріальних популяціях тим вища, чим більше гине клітин, проте має залишитись певна кількість живих клітин для відбору мутантів (близько 1%).

Встановлено, що летальна доза (LD) та термін опромінення для одержання 1% живих клітин для різних штамів були різними (рис. 2, 3).

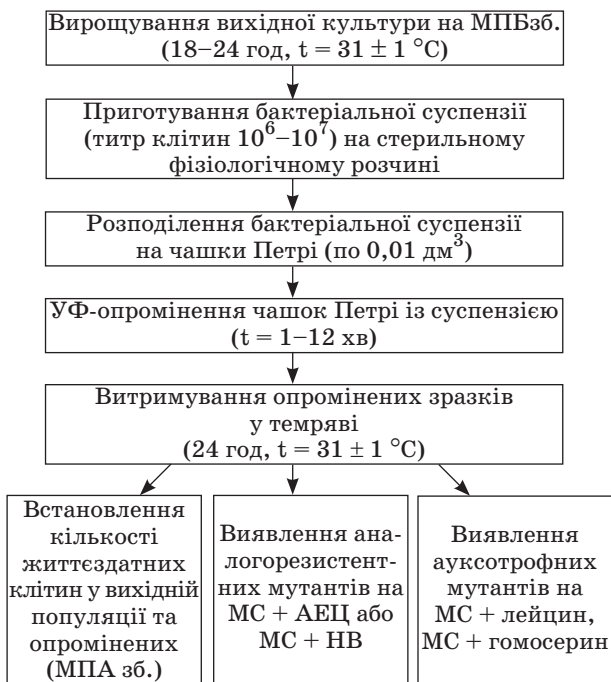


Рис. 1. Загальна схема досліджень мутагенезу продуцентів лізину та треоніну

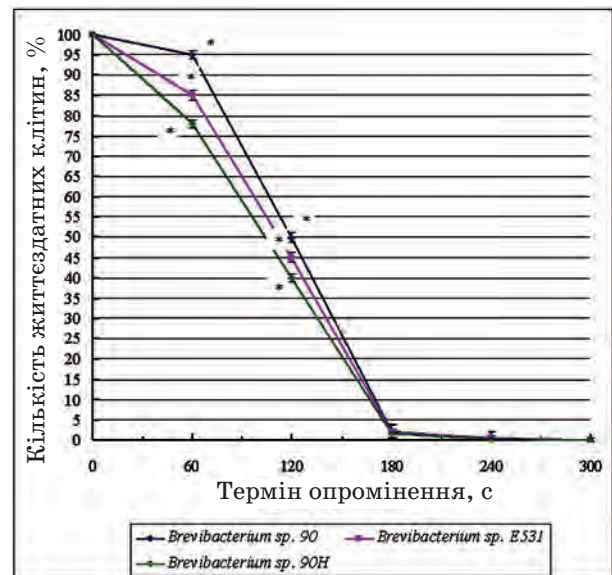


Рис. 2. Життєздатність клітин *Brevibacterium sp.* під дією УФ опромінення.

Тут і далі: * — $P < 0,05$. Контролем слугував показник «колонієутворювальні одиниці» — КУО (100%) в неопроміненій бактеріальній суспензії

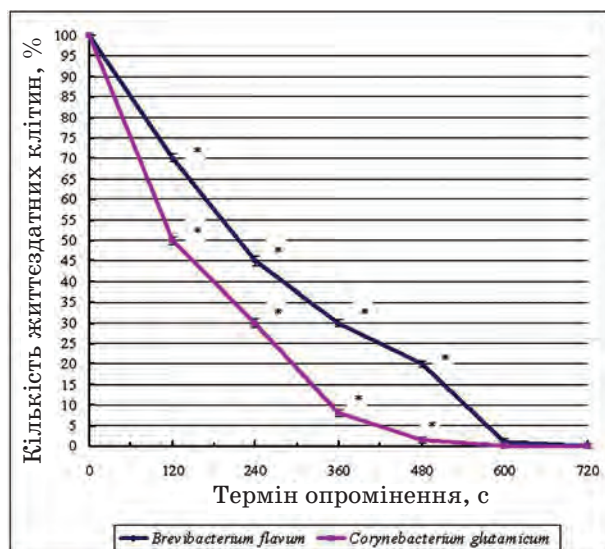


Рис. 3. Життєздатність клітин *Brevibacterium flavum* та *Corynebacterium glutamicum* під дією УФ опромінення

Як видно з рис. 2, життєздатність клітин під дією УФ змінювалася залежно від тривалості опромінення. Для трьох штамів *Brevibacterium* sp. летальною дозою було опромінення протягом 4–5 хв. Оптимальним терміном для мутагенезу встановлено 3 хв, що корелює з даними роботи [12], у якій автори здійснювали УФ-мутагенез на *Brevibacterium lactofermentum*.

Згідно з рис. 3 летальною дозою для *Brevibacterium flavum* та *Corynebacterium glutamicum* було опромінення протягом 12 та 10 хв відповідно, а оптимальний термін для мутагенезу становив 10 хв для *Brevibacterium flavum* і 8 для *Corynebacterium glutamicum*.

Серед усіх одержаних мутантів для подальшого дослідження відібрали представників роду *Brevibacterium* і перевірили їх на біосинтез цільових амінокислот (рис. 4, 5).

Як впливає з рис. 4, у мутантних штамів рівень синтезу лізину був вищим більш ніж у п'ять разів. З рис. 5 видно, що у мутантних штамів рівень синтезу треоніну був вищим більш ніж у 2 рази.

Стійкість до аналогів можуть спричинювати також мутації, які просто блокують надходження їх у клітини. Тому було проведено декілька етапів селекції з використанням поступового підвищення концентрації аналогів (від 0,25 мг/дм³ до 0,4 мг/дм³ АЕЦ та НВ).

Опромінену бактеріальну суспензію висівали глибинним способом на чашки Петрі з МПАзб. (для встановлення титру клітин), на МС із лейцином або гомосерином, з АЕЦ або НВ (для відбору мутантів за критеріями

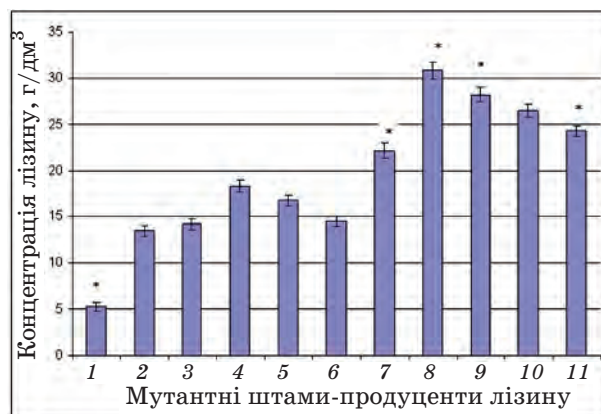


Рис. 4. Накопичення лізину мутантними штамми *Brevibacterium* sp.:

1 — штам до опромінення УФ;
2–11 — одержані УФ-мутанти.

Контролем слугував показник синтезу лізину штамом до опромінення

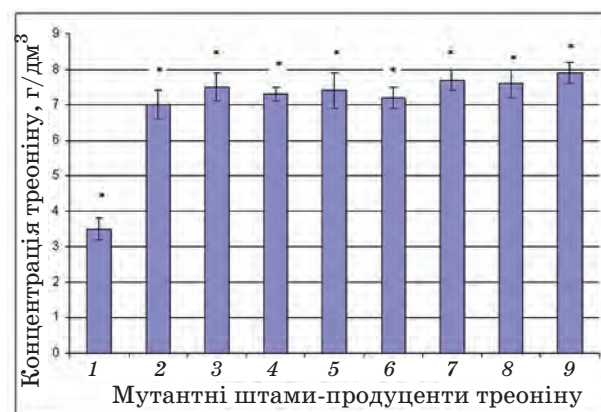


Рис. 5. Накопичення треоніну мутантними штамми *Brevibacterium flavum*:

1 — штам до опромінення УФ;
2–9 — одержані УФ-мутанти.

Контролем слугував показник синтезу треоніну штамом до опромінення

ауксотрофності та аналогорезистентності). Результати наведено в табл. 1.

Опромінювали кожен штам, а вибір мутантів здійснювали за критеріями ауксотрофності та стійкості до АЕЦ і НВ для продуцентів лізину й треоніну. За частоти мутацій $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ одержано АЕЦ-стійкі продуценти лізину, а $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ — НВ-стійкі продуценти треоніну.

Вихідні культури й одержані мутантні штамми перевіряли на чутливість до антибіотиків з метою встановлення генетичних маркерів. Результати подано в табл. 2.

Як впливає з наведених даних, серед досліджених вихідних і мутантних штамів є такі, що змінили чутливість до антибіотиків (тетрацикліну, стрептоміцину та левоміцетину).

Таблиця 1. Утворення мутантних штамів під дією УФ

Розведення	КУО мутантних клонів на МС+			
	Лейцин	Гомосерин	АЕЦ	НВ
<i>Brevibacterium</i> sp.				
10 ⁻¹	0	0	0	0
10 ⁻²	0	0	0	0
10 ⁻³	(2,1 ± 0,3)·10 ⁻³	(1,4 ± 0,2)·10 ⁻³	(1,1 ± 0,2)·10 ⁻³	0
10 ⁻⁴	(7,3 ± 0,2)·10 ⁻⁴	(2,3 ± 0,2)·10 ⁻⁴	(1,2 ± 0,3)·10 ⁻⁴	0
10 ⁻⁵	(10,5 ± 0,3)·10 ⁻⁴	(4,2 ± 0,4)·10 ⁻⁴	(1,0 ± 0,2)·10 ⁻⁵	0
<i>Brevibacterium flavum</i>				
10 ⁻¹	0	0	0	0
10 ⁻²	0	0	0	0
10 ⁻³	(2,5 ± 0,3)·10 ⁻³	(2,1 ± 0,3)·10 ⁻³	0	(1,4 ± 0,2)·10 ⁻³
10 ⁻⁴	(3,3 ± 0,2)·10 ⁻⁴	(3,4 ± 0,3)·10 ⁻³	0	(1,5 ± 0,3)·10 ⁻⁴
10 ⁻⁵	(1,8 ± 0,3)·10 ⁻⁵	(5,2 ± 0,2)·10 ⁻⁴	0	(1,8 ± 0,3)·10 ⁻⁵

Таблиця 2. Чутливість вихідних та мутантних штамів до антибіотиків

Антибіотики	Штами-продуценти							
	<i>Brevibacterium</i> sp. E531	<i>Brevibacterium</i> sp. 90	<i>Brevibacterium</i> sp. 90H	<i>Brevibacterium flavum</i>	Мутантний штам-продуцент треоніну	Мутантний штам-продуцент лізину	Мутантний штам, стійкий до АЕЦ	Мутантний штам, стійкий до НВ
Азитроміцин	S	S	S	S	S	S	S	S
Ампіцилін	S	S	S	S	S	S	S	S
Цефтріаксон	S	S	S	S	S	S	S	S
Бензилпеніцилін	S	S	S	S	S	S	S	S
Гентаміцин	S	S	S	S	S	S	S	S
Тетрациклін	S	S	S	S	R	S	S	S
Стрептоміцин	S	S	S	S	S	S	S	R
Левоміцетин	S	S	S	S	S	S	R	S
Канаміцин	S	S	S	S	S	S	S	S

Примітка. S — чутливий; R — резистентний до дії антибіотика. Контролем слугувала наявність росту культур на МПА зб. без додавання антибіотиків.

З метою визначення стабільності одержаних мутантних штамів їх пересівали впродовж 2 міс з інтервалом 2 тижні на тверде і рідке середовища з послідовним визначенням кількості синтезованих треоніну та лізину відповідно. Показник синтезу треоніну від пересіву до пересіву був майже однаковим (7,85–7,9 г/дм³), лізину — також не змінювався (30,85–31,9) г/дм³.

Використовуючи одержані мутантні штами, провели культивування на м'ясовому середовищі в умовах аерації за $t = 31 \pm 1$ °C. Критеріями оцінювання процесу культивування слугували кількість синтезованих амінокислот, коефіцієнт конверсії цукру (розрахункова величина), концентрація біомаси штамів-продуцентів за ОГ та зміна рН середовища (табл. 3).

Таблиця 3. Синтез цільових амінокислот та коефіцієнти конверсії джерел живлення

Продуценти	pH	ОГ (1:10), λ_{440}	Концентрація сахарози, %	Концентрація ³ лізину, г/дм ³	Концентрація треоніну, г/дм ³	Конверсія цукру в ці- льову аміно- кислоту, %
Вихідне середовище	7,9 ± 0,1	0,2 ± 0,1	8,2 ± 0,5	2,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	–
Продуценти лізину						
<i>Brevibacterium</i> sp.	7,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	5,6 ± 0,3	5,9 ± 0,5	1,5 ± 0,3	22,7 ± 1,7
<i>Brevibacterium</i> sp. ІМВ В-7447	7,3 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,3	31,9 ± 0,4	1,8 ± 0,4	46,4 ± 2,2
Продуценти треоніну						
<i>Brevibacterium flavum</i>	6,6 ± 0,1	1,1 ± 0,1	5,4 ± 0,2	2,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2	7,1 ± 0,1
<i>Brevibacterium flavum</i> ІМВ В-7446	6,7 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,3	4,5 ± 0,5	7,9 ± 0,3	11,8 ± 0,2

Вихідний штам-продуцент лізину на м'ясових середовищах накопичував біомасу, проте мав низький рівень синтезу лізину і в незначній кількості споживав цукор із середовища (конверсія цукру — 22,7%). Мутантний штам на м'ясових середовищах активно накопичував біомасу і мав підвищений рівень синтезу лізину — більш ніж у 5 разів порівняно з вихідним штамом. Також мутантний штам активно споживав цукор із середовища (конверсія цукру становила 46,4%).

Вихідний штам *Brevibacterium flavum* на м'ясових середовищах накопичував біомасу, мав низький рівень синтезу треоніну і споживав цукор із середовища в незначній кількості (конверсія — 7,1%). Мутантний штам *Brevibacterium flavum* за культивування на м'ясових середовищах продукував у 4 рази більше треоніну, ніж вихідний, та інтенсивно споживав цукор (конверсія — 11,8%).

Таким чином, досліджено вплив УФ-опромінення на вегетативні клітини бревібактерій та коринебактерій, визначено LD для культур і відібрано, з використанням генетичних маркерів, найперспективніші мутантні штами для продукування незамінних амінокислот. У результаті дії УФ-опромінення на продуценти треоніну та лізину одержано мутантний штам *Brevibacterium flavum* ІМВ В-7446 (продуцент треоніну), який за біосинтетичною активністю та продукуванням амінокислоти відрізнявся від вихідної культури більш ніж у 4 рази, а також мутантний штам *Brevibacterium* sp. ІМВ В-7447, який продукував майже у 5 разів більше лізину порівняно з вихідним штамом. Отримані штами-продуценти депоновано в Національному депозитарії мікроорганізмів «Інституту мікробіології і вірусології» НАН України.

REFERENCES

- Pyrog T. P., Ignatova O. A. General Biotechnology: Textbook. Kyiv: NUFT. 2009, 336 p. (In Ukrainian).
- Pidgorsky V. S., Iutynska G. O., Pyrog T. P. Intensification of technologies of microbial synthesis. Kyiv: Naukova dumka. 2010, 328 p. (In Ukrainian).
- available at <http://www.biotechnolog.ru> (In Russian).
- Hermann T. Industrial Production of amino acid by coryneform bacteria. *J. Biotechnol.* 2003, V. 104, P. 155–172.
- Anastassiadis S. L-Lysine Fermentation. *Recent Patent Biotechnology.* 2007, N 1, P. 11–24.
- Fedorenko V. O., Ostash B. O., Honchar M. V., Rebets Yu. V. Large workshop on genetics, genetic engineering and analytical biotechnology of microorganisms. Lviv: Vidavnychyi tsentr LNU imeni Ivana Franka. 2006, 279 p. (In Ukrainian).
- Totskiy V. Genetics. Odesa: Astroprint. 2002, 712 p. (In Russian).
- Shulga S. M., Tigunova O. O., Tkachenko A. F., Bejko N. E., Andriiash G. S., Pryyomov S. G. Threonine biosynthetic process intensification. *Biotechnologiya.* 2011, 4(5), 97–102. (In Ukrainian).
- Polygalina G. V. Technochemical control of alcohol and distillery industries. Moscow: Kolos. 1999, 336 p. (In Russian).
- Lysak V. V. Microbiology. Uchebnoe posobie. Minsk: BGU. 2007, 469 p. (In Russian).
- Andriiash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. Auxotrophy of products of lysin. *Biotechnologiya.* 2012, 5(1), 70–77. (In Ukrainian).
- Yetti M. I., Pudjiraharti S. Strain improvement of *Brevibacterium* sp ATCC 21866 for L-lysine production using ultra violet irradiation. *Technol. Indonez.* 2004, N 27, P. 9–16.
- Andriiash G. S., Zabolotna G. M., Shulga S. M. Regulation and intensification ways of lysine biosynthesis. *Microbiologiya ta Biotechnologiya.* 2012, N 4, P. 6–17. (In Ukrainian).

МУТАНТНЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ ЛИЗИНА И ТРЕОНИНА

Г. С. Андрияш
Г. М. Заболотная
С. М. Шульга

ГУ «Институт пищевой биотехнологии
и геномики НАН Украины», Киев

E-mail: Shulga5@i.ua

Исследованы штаммы микроорганизмов — продуцентов незаменимых аминокислот аспаргатного семейства: *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины» по биосинтетической активности относительно лизина и треонина. После УФ-облучения были получены активные штаммы-продуценты, изучены биологические особенности этих микроорганизмов и определена их биосинтетическая эффективность.

С помощью анализа регуляторной и аналогорезистентной ауксотрофности выбраны новые мутантные штаммы треонина и лизина. Исследована чувствительность исходных и мутантных штаммов-продуцентов к пенициллинам, макролидам, цефалоспорином, тетрациклинам и другим группам антибиотиков. Определена биосинтетическая активность полученных продуцентов треонина — *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 и лизина — *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 по продуцированию целевых аминокислот. Штаммы депонированы в «Национальном депозитарии микроорганизмов» Института микробиологии и вирусологии НАН Украины.

Ключевые слова: продуцирование лизина и треонина, мутантные штаммы-продуценты.

THE MUTANT STRAINS OF MICROORGANISMS — PRODUCERS OF LYSINE AND THREONINE

G. S. Andriiash
G. M. Zabolotna
S. M. Shulga

SI «Institute of Food Biotechnology
and Genomics of the National Academy
of Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

E-mail: Shulga5@i.ua

Strains-producers of essential amino acids of aspartate family such as *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium* sp. 90, *Brevibacterium* sp. 90H, *Brevibacterium* sp. E531 from «Collections strains and lines of plants for food and agricultural biotechnology» of «Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine» for biosynthetic activity for lysine and threonine were investigated. Active strains-producers of amino acids were obtained after UV irradiation, biological characteristics of these organisms were studied and their biosynthetic efficiency was estimated.

New mutant strains of threonine and lysine were selected using analysis of regulatory and analogoresistent auxotrophy. Sensitivity of output and mutant strain-producers to penicillins, macrolides, cephalosporins, tetracyclines, and other groups of antibiotics was investigated. Biosynthetic activity of obtained threonine producers — *Brevibacterium flavum* IMB B-7446 and lysine — *Brevibacterium* sp. IMB B-7447 on the production of target amino acids was determined. Strains are deposited in the «National Depository microorganisms» of the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Key words: lysine, threonine, mutant strains-producers, ultraviolet irradiation.