

С. И. АЛИХАНЯН

ПРИКЛАДНЫЕ УСПЕХИ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ*

Ум человеческий открыл много диковинного в природе и откроет еще больше, увеличивая тем свою власть над ней...

В. И. Ленин, полн. собр. соч., т. 18, стр. 298.

Среди микробиологов долгое время господствовала точка зрения, что они могут решать все проблемы, связанные с исследованием микроорганизмов самостоятельно, без других смежных наук, в том числе и без генетики. Главным тезисом этой точки зрения было утверждение, что микроорганизмы не подчиняются мутационной изменчивости, что в мире микроорганизмов господствует адекватная изменчивость, что в основе изменчивости микроорганизмов лежит прямое приспособление к окружающим условиям, без всякой связи с наследственной перестройкой, связанной с каким-либо генетическим аппаратом клетки.

Первая брешь в этой концепции была пробита, когда блестящие исследования с нейроспорой не только подтвердили универсальность генетических законов, но и послужили основанием для провозглашения очень важного научного принципа — «один ген — один фермент», по своему существу действующего и по сегодняшний день. Микробиологи принуждены были сделать уступку в отношении грибов, ревностно охраняя ламаркистские принципы в бактериологии. Очень долго цитадель ламаркизма оборонялась, пока ряд основополагающих работ не обратили армию ламаркистов в разрозненных бойцов, по-прежнему отбивающихся от огромного числа фактов, опровергающих искусственно сформулированную концепцию «собственно микробиологических принципов», либо вследствие незнания обстановки, либо будучи фанатично преданными завещанным им идеям.

Новая генетика микроорганизмов была сформулирована на основе четырех открытий. Первым было открытие генетической трансформации. Случай с этим открытием был очень парадоксальным. Упорно охраняемая от «агрессии» генетики, «бактерия» оказалась объектом, провозгласившим основной принцип современной генетики о связи генетического аппарата клетки с молекулой ДНК. Большую роль сыграло второе открытие, связанное с доказательством приложимости концепций мута-

* Текст доклада, прочитанного на конференции армянского отделения ВОГИС, посвященной 100-летию со дня рождения В. И. Ленина.

ционной изменчивости и к микроорганизмам. Тем самым было экспериментально опровергнуто существование адекватной изменчивости у бактерий, т. е. так называемое учение о наследовании приобретенных признаков. Работы Дельбрюка и Лурия, Ньюкомба и, наконец, Ледерберга не оставили сомнений в том, что изменчивость микроорганизмов подчиняется закономерностям, господствующим у высших форм организма. Третьим открытием, повлиявшим на развитие современной генетики, было открытие своеобразного полового процесса у бактерий, так называемого эффекта конъюгации, на основе которого был разработан гибридологический анализ, т. е. стал возможным генетический анализ у микроорганизмов, разрешающая способность которого оставила далеко позади возможности генетического анализа даже дрозофилы. Четвертое открытие, так называемая генетическая трансдукция, и далее развитие генетики фагов, разработка у них метода рекомбинации еще более повысили разрешающую способность генетического анализа и довели его до молекулярного уровня.

Эти четыре открытия сыграли решающую роль в развитии современной генетики. Вместе с решающей ролью генетики микроорганизмов в становлении современной генетики, называемой еще молекулярной генетикой, как высшего этапа в развитии хромосомной теории наследственности, генетика микроорганизмов прекрасное подтверждение того, как передовая теория естествознания широко раздвигает практические горизонты, создает основу для технической революции и, больше того, создает новую отрасль промышленности. Вряд ли можно спорить о том, что успехи генетики микроорганизмов, ее основополагающие открытия, создали реальные предпосылки для развития микробиологической промышленности. Речь идет не о простом совпадении. Открытие биохимических мутаций, у нейроспоры, собственно, и есть начало развития генетики микроорганизмов, в эпоху открытия антибиотиков — продуктов микробиологического синтеза. С этим событием связано становление микробиологической промышленности. Вслед за антибиотиками было показано, что мощный аппарат биосинтеза микроорганизмов может вырабатывать витамины (B_{12} и рибофлавин), ферменты (проназа, кератиназа и ряд амилолитических ферментов), аминокислоты, в особенности лизин, глютаминовую кислоту, триптофан и другие факторы роста (гиббереллины). Наконец, была открыта способность микроорганизмов участвовать на различных стадиях химического синтеза, как, например, в трансформации микроорганизмами стероидных препаратов, в синтезе полимеров (декстрана), на промежуточном этапе синтеза витамина С (окисление сорбозы в сорбит в производстве аскорбиновой кислоты). Все открытия технической микробиологии совпадают во времени с открытиями в генетике микроорганизмов. Открытие паразитических свойств микроорганизмов синтезировать самые разнообразные вещества выдвинуло на первый план проблему повышения эффективности «работы» микроорганизмов, т. е. продуктивности штаммов. Вот тут и столкнулись запросы практики с успехами современной генетики.

Практическое приложение генетики в микробиологии нашло главное свое применение в биосинтетической промышленности. Основными путями практического приложения генетики в этой новой отрасли народного хозяйства были использование индуцированных мутаций, генетический блок на путях биосинтеза путем получения биохимических мутаций и гибридизация. Необходимо отметить, что эти генетические приемы в различной степени применялись в селекции микроорганизмов. Использование индуцированной мутагенами изменчивости является основным методом селекции почти всех продуцентов антибиотиков. Метод получения биохимических мутаций применяется главным образом у микроорганизмов с расшифрованным механизмом биосинтеза лизина, инозиновой кислоты, глютаминовой кислоты, триптофана и других соединений. Метод гибридизации у полезных форм микроорганизмов, хорошо разработанный у актиномицетов, аспергиллов и дрожжей, пока еще не нашел широкого применения в практической селекции.

Индуцированный мутагенез в селекции микроорганизмов

Селекция с применением мутагенов явилась наиболее интенсивной областью практического приложения успехов генетики в микробиологии. Наиболее активно мутагены были использованы в селекции продуцентов антибиотиков.

К сегодняшнему дню накоплен большой материал по действию мутагенов в селекции микроорганизмов. Рядом исследований был показан решающий эффект в отборе лучших вариантов-продуцентов пенициллина, стрептомицина, тетрациклинов, олеандомицина, эритромицина и др. антибиотиков среди колоний, выращенных из конидий, обработанных такими мутагенами, как азотистая форма иприта, этиленимин, диэтилсульфат, рентгеновские и УФ лучи, быстрые нейтроны. Было показано, что добиться резкого сдвига активности в этом случае можно в результате ступенчатого отбора. Накапливая на каждой ступени отбора небольшие, иногда малозаметные отклонения по продуктивности, исследователи практически накапливали «малые мутации», участвующие в детерминации количественных признаков, которые, как известно, находятся под полигенным контролем. В результате этих работ удалось в несколько раз повысить активность исходных штаммов.

Исследования проблем мутагенеза количественных признаков у актиномицетов осложнились отсутствием методов генетического анализа у этих практически важных микроорганизмов.

Функцией эффекта мутагенеза на изменчивость количественных признаков является нарушение нормальной кривой распределения вариантов по способности синтезировать тот или иной продукт. Эффективность индуцированной изменчивости определяется главным образом анализом серии кривых и окончательной проверкой отобранных вариантов в производственных условиях, завершающейся внедрением новых, более активных штаммов.

Помимо практического эффекта мутагенов, в селекции микроорганизмов накоплен также богатый материал, позволяющий судить о некоторых связях индуцированной изменчивости по количественным признакам с действием мутагенов. Среди них главными являются:

1. Сравнительная оценка эффективности различных мутагенов.
2. Определение роли различных доз мутагенов.
3. Установление корреляции между морфологической изменчивостью и изменчивостью по антибиотикообразованию.
4. Выяснение роли генотипа в изменчивости по антибиотикообразованию.
5. Оценка особенностей изменчивости у высокоактивных и низкоактивных штаммов.
6. Изучение эффекта «больших мутаций» в индуцированной изменчивости.

Так, на большом числе опытов с актиномицетами, наиболее рельефно с продуцентом олеандомицина *Actinomyces antibioticus*, было показано, что:

а) в опытах с этиленимином, диэтилсульфатом, быстрыми нейтронами, ультрафиолетовыми и рентгеновскими лучами частота плюс-вариантов достоверно превышает частоту плюс-вариантов, возникающих в естественном рассеиве;

б) быстрые нейтроны оказались эффективнее ультрафиолетовых лучей и диэтилсульфата. В другом опыте хлоргидрат этилового эфира — S-2-хлорэтил DL цистеина, вызывая большую изменчивость по плюс-вариантам у *Act. olivaceus*—продуцента витамина B₁₂—не повышал, однако, изменчивости по спектру минус-вариантов.

Сравнение действия быстрых нейтронов, рентгеновских лучей и этиленимина в селекционном опыте на четырех ступенях отбора показало преимущество первых двух мутагенов.

В литературе имеются данные по изучению роли различных доз мутагенов в изменчивости по плюс- и минус-вариантам. В опытах с большим числом химических и физических мутагенов было показано, что наибольшее число вариантов с повышенной активностью возникает в диапазоне умеренных доз. Дальнейшее повышение дозы мутагенов, вызывая повышение числа морфологических и других альтернативных мутаций, приводит к резкому снижению числа плюс-вариантов и повышению числа минус-вариантов.

Наряду с этим эффектом мутагенов обнаружена роль штаммов в особенностях мутационной изменчивости. Так, например, у «диких» штаммов частота плюс-вариантов резко превосходит частоту минус-вариантов, а у штаммов, уже подвергавшихся мутантной селекции, частота минус-вариантов превосходит частоту плюс-вариантов. Помимо этого, частота минус-вариантов, как было отмечено выше, повышается по мере повышения дозы мутагена, образуя пик при дозе, вызывающей максимальную частоту морфологических и других альтернативных мутаций.

Таким образом, можно считать, что в опытах по применению в се-

лекции микроорганизмов мутагенов а) последние повышают изменчивость по количественным признакам и создают гетерогенную популяцию колоний актиномицетов, благоприятную для отбора активных вариантов; б) мутагены наиболее эффективно действуют в диапазоне умеренных доз; в) большую роль в оценке эффективности мутагенов и их доз в индуцированной изменчивости по количественным признакам играет учет особенностей не только вида, но и штамма, длительности его селекции, падения эффективности мутагенов в дальнейшей селекции.

В связи с последней особенностью возник вопрос, как преодолеть эту ограниченность высокоселекционных, т. е. высокоактивных штаммов.

Для решения этого вопроса нужно было найти критерий объективной оценки падения эффективности мутагена в селекции. В ряде экспериментов было показано, что таким критерием является определение коэффициента изменчивости (cv). Особенно наглядно это было показано у *Act. antibioticus*, продуцента олеандомицина, когда на четвертой ступени отбора коэффициент изменчивости резко упал, и отбор практически не давал эффекта. Для преодоления этой ограниченности селекции под действием диэтилсульфата была получена «большая» мутация (№ 5001). Таким путем был получен штамм с резко изменившимися особенностями (структура колонии, интенсивное выделение темного пигмента и др. признаки). Дальнейшая селекция с применением диэтилсульфата вновь была очень эффективна. Коэффициент изменчивости у этого штамма резко поднялся.

Такой сдвиг коэффициента изменчивости в результате «большой» мутации был описан и у другого вида, *Act. erythreus*. На основании этих наблюдений можно прийти к следующим выводам:

- а) стабилизация признака в популяции колоний может быть нарушена радикальной перестройкой генотипа;
- б) генотип играет важную роль в характере изменчивости количественных признаков;
- в) резкое нарушение физиологических корреляций в результате большой мутации приводит к резкому повышению коэффициента изменчивости.

В литературе описывается много случаев большого морфологического разнообразия среди колоний, выращенных из спор, обработанных мутагеном, и морфологического отличия новых, более активных штаммов от исходного штамма. В одном из опытов с рентгеновскими лучами по продуктивности морфологически измененные и неизмененные колонии *Act. subtrropicus* резко отличаются друг от друга. В группе морфологически измененных форм преобладали нулевые и минус-формы, тогда как плюс-варианты составляют большую часть неизмененных форм. Аналогичное распределение по активности разных групп колоний у морфологически измененных и неизмененных колоний описано у продуцента стрептомицина и ряда других микроорганизмов.

На основании этих наблюдений можно сделать два заключения:

1. Резкие изменения морфологической характеристики приводят чаще всего к полной потере или к существенной потере активности.

2. Резкие сдвиги активности часто бывают связаны с морфологическими изменениями колонии.

Отсутствие сведений о механизме биосинтеза антибиотиков очень существенно влияет на характер исследований индуцированного мутагенеза в селекции микроорганизмов. Несмотря на то, что эти исследования несут на себе отпечаток эмпиризма, у некоторых форм микроорганизмов они остаются основным и наиболее широко используемым методом создания высокоактивных штаммов.

Гибридизация микроорганизмов в их селекции

Генетический анализ у бактерий *E. coli*, разработанный на основе конъюгации, у *Bac. subtilis* на основе трансформации, у *Salmonella typhimurium* на основе генетической трансдукции доведен до максимального совершенства. К сожалению, не все эти микроорганизмы применяются в микробиологической промышленности и использовать эти достижения генетики для практической селекции нельзя.

У классического объекта селекции микроорганизмов—актиномицетов—рекомбинация открыта сравнительно недавно, и поэтому механизм рекомбинации у них до самого последнего времени оставался неясным. Если раньше считали, что генетическая рекомбинация у актиномицетов сходна с парасексуальными процессами у грибов, то в настоящее время можно считать установленным, что по своим принципиальным особенностям механизм генетической рекомбинации у актиномицетов очень сходен с таковым у бактерий. Пользуясь методами рекомбинации, на основе генетического анализа можно будет выяснить пути биосинтеза антибиотических веществ, изучить генетический механизм, контролирующий антибиотикообразование, и использовать эти сведения для селекции.

Первым главным итогом разработки генетического анализа у актиномицетов явилось установление кольцевой карты сцепления *Str. (Act.) coelicolor*, которая наиболее полно отражает картину расположения различных генетических локусов. Характерной особенностью генетической карты *Str. coelicolor* является неслучайное расположение на ней генетических локусов, при изучении локализации которых было обнаружено, что в ряде случаев локусы, контролирующие родственные биохимические функции, тесно сцеплены между собой. Важно подчеркнуть еще применение селективных методов отбора рекомбинантов, которое показало, что явление генетической рекомбинации широко распространено у различных представителей рода *Actinomyces* (в частности, у *Act. fitosus*, являющегося продуцентом окситетрациклина).

Выбор *Str. coelicolor* в качестве объекта генетических исследований у актиномицетов оказался удачным во многих отношениях, кроме одного — *Str. coelicolor* не является продуцентом антибиотика и поэтому

антибиотикообразование — признак, присущий многим актиномицетам, не был использован при генетическом анализе этого организма.

Наше внимание привлек продуцент окситетрациклина *Act. rimosus*. В отличие от *Str. coelicolor*, *Act. rimosus* очень мало изучен генетически. Правда, некоторые успехи в гибридизации *Act. rimosus* все-таки были получены. Необходимо заметить, что данные, полученные при изучении генетической рекомбинации у *Act. rimosus*, согласуются с результатами генетических исследований у *Str. coelicolor*. Было естественно обратить внимание на изучение генетического контроля синтеза окситетрациклина. При этом необходимо было получить мутации, контролирующие антибиотикообразование, для использования их в качестве генетических маркеров и далее с помощью генетического анализа таких мутаций локализовать генетические факторы, контролирующие антибиотикообразование, и попытаться определить их число.

С этой целью были получены мутанты с нарушениями синтеза антибиотиков у активных штаммов *Act. rimosus*. Если исходный штамм синтезировал около 3000 мкг/мл окситетрациклина, количество антибиотика, образуемое неактивными мутантами, составляло всего 20—70 мкг/мл, а некоторые из них выделяли лишь следы его.

В ряде комбинаций этих неактивных мутантов при их совместном культивировании на ферментационной среде наблюдалось образование значительных количеств антибиотика.

На основании генетического анализа этих мутантов были получены данные, которые показали, что можно наметить по крайней мере две группы генетических локусов, контролирующих синтез тетрациклина у *Act. rimosus*. При скрещивании между собой мутантов из второй и первой групп активные рекомбинанты не возникали, что свидетельствовало о тесном сцеплении соответствующих локусов. В скрещиваниях между мутантами обеих групп активные рекомбинанты возникали. Таким образом, генетические исследования неактивных мутантов показали, что синтез окситетрациклина контролируется по крайней мере несколькими генетическими локусами. Причем эти две группы локусов, будучи сцеплены между собой, занимают более отдаленные друг от друга местоположения в группе сцепления *Act. rimosus*.

Наряду с генетическими исследованиями актиномицетов и известными работами по парасексуальному циклу пенициллов, был сделан ряд попыток использовать гибридизацию в селекции продуцентов пенициллина и окситетрациклина.

Опережая несколько изложение материала, необходимо отметить, что положительный эффект в этой области еще очень незначителен.

Первые гибриды у производственных штаммов микроорганизмов были описаны у продуцентов пенициллина. Был получен большой ряд диплоидов у *P. chrisogenum*, среди которых случаев резкого повышения активности у гибридов, по сравнению с активностью исходных штаммов, было очень мало.

Позднее было описано несколько диплоидов между двумя биохимическими мутантами высокоактивных штаммов. Активность этих гибри-

дов превосходила по активности пенициллинообразования исходные штаммы. Было выдвинуто предположение, что на активность диплоидов могут влиять генеалогические взаимоотношения скрещиваемых штаммов. При тщательной проверке этого положения у серии диплоидов, полученных между биохимическими мутантами шести штаммов *P. chrisogenum*, находящихся в самых различных генеалогических взаимоотношениях, положительный эффект не был воспроизведен. Наряду с изучением активности у диплоидов была подробно изучена активность синтеза пенициллина у ряда гаплоидных и диплоидных рекомбинантов, выделенных из диплоидов. Продуктивность всех рекомбинантов оказалась ниже продуктивности исходного диплоида, а ряд диплоидных рекомбинантов имели активность даже более низкую, чем исходные гаплоиды.

Вместе с тем было показано, что размах как спонтанной изменчивости по пенициллинообразованию так и индуцированной УФ лучами, у диплоидных штаммов выше, чем у исходных гаплоидных.

Был описан случай, когда после обработки конидий диплоида продуцента пенициллина мутагенным фактором были отобраны два варианта, превышающие активность диплоида на 25—35%.

В литературе имеются данные по гибридизации другой группы грибов — аспергиллов, продуцентов лимонной кислоты, протеолитических ферментов и ряда других веществ. У этих микроорганизмов практический эффект гибридизации на синтез органических кислот не отличается от случаев, описанных в отношении продуцентов пенициллина.

Несмотря на то, что практический эффект от скрещивания грибов в настоящее время еще малоэффективен, такие эксперименты все же обогащают наши знания о механизмах биосинтеза различных метаболитов и, что еще более важно, наше понимание природы генетических изменений, происходящих в процессе селекции.

О практической гибридизации промышленных штаммов актиномицетов имеется еще меньше сведений.

В отличие от пенициллов и аспергиллов, у которых можно получить диплоиды и тем самым ожидать у них основной эффект, используемый обычно у гибридов, — гетерозис, у актиномицетов, у которых характер гибридизации более сходен с бактериями, нужно искать свои, особые пути прикладного использования гибридизации. У актиномицетов было отмечено, что прототрофные рекомбинанты значительно варьируют по своей активности в пределах одной комбинации скрещивания;

значительные различия наблюдаются также в уровне антибиотической активности в разных комбинациях одного и того же скрещивания;

наблюдаются самые разнообразные соотношения активностей исходных штаммов и прототрофных рекомбинантов в различных скрещиваниях (а также в пределах одного скрещивания).

По своей активности прототрофные рекомбинанты актиномицетов могут: а) уступать обоим исходным штаммам; б) занимать промежуточное положение между двумя штаммами; в) достигать уровня актив-

ности более активного штамма; г) превышать по своей активности более активный штамм.

Полученные данные не дают, однако, ответа на вопрос, чем определяется уровень антибиотической активности рекомбинантов в разных скрещиваниях, почему различаются по своей активности рекомбинанты из разных комбинаций одного скрещивания и в пределах каждой из этих комбинаций.

Несмотря на некоторые особенности гибридизации актиномицетов, особого отличия в практическом эффекте этих форм от пенициллов и аспергиллов не было получено. И все же вопрос о практическом использовании гибридизации у микроорганизмов не может быть полностью отброшен и должен быть в арсенале средств селекционера, как метод, дающий неплохой эффект при наличии штаммового разнообразия.

Если гибридизация актиномицетов не дала пока прямого эффекта на признак антибиотикообразования, в литературе все же описаны случаи получения гибридного эффекта (точнее рекомбинантного эффекта) по ряду других технологических свойств, как-то преодоление пенообразования в процессе ферментации в производственных условиях, возникновение устойчивости к высоким концентрациям фосфора в питательной среде. Аналогичный «непрямой» эффект гибридизации описан у пенициллов, когда путем обработки мутагенами диплоидных штаммов резко повышена активность и получены высокоактивные штаммы («Новый гибрид» и др.).

Принципы биохимической генетики в селекции микроорганизмов

Большое место в селекции микроорганизмов занимает третий метод, метод получения биохимических мутаций. Несмотря на новизну, при применении этого пути селекции получены замечательные результаты.

Молекулы вторичных метаболитов более сложны, чем молекулы первичных метаболитов; механизмы биосинтеза многих из них изучены только в общих чертах, и в настоящее время имеется очень мало сведений о ферментных системах, осуществляющих отдельные биохимические реакции в цепи синтеза этих веществ. Напротив, основные пути биосинтеза таких первичных метаболитов, как аминокислоты, нуклеотиды, отчасти витамины, изучены у микроорганизмов достаточно детально. Известно, что концентрация первичных метаболитов в клетке находится под строгим контролем, осуществляющимся с помощью хорошо изученных механизмов репрессии и ретроингибирования, благодаря чему в обычных условиях первичные метаболиты не накапливаются в клетках в больших количествах. В противоположность этому, вторичные метаболиты часто образуются в больших количествах; исследование механизмов регуляции их биосинтеза находится на самом начальном этапе.

Большое количество сведений о путях биосинтеза аминокислот и нуклеотидов и механизмах, контролирующих скорость их синтеза, а также применение генетических методов блокирования различных звеньев

этого процесса определяют специфичность методов селекции продуцентов соответствующих первичных метаболитов, основанных на использовании ауксотрофов, т. е. получении биохимических мутантов и мутантов с нарушенной системой регуляции.

Лет 25 тому назад в генетике было сделано очень важное открытие, когда у нейроспоры были получены первые биохимические мутации и было показано, что синтез ферментов находится под генетическим контролем. Тогда же был сформулирован принцип «один ген — один фермент». Это открытие ознаменовало собой не только становление нового раздела в генетике — биохимической генетики, но и определило начало новой эры в генетике, эры, определившей молекулярные подходы при решении генетических закономерностей.

Характерной особенностью биохимических, или, как их еще называют, ауксотрофных мутантов, является их способность накапливать промежуточные продукты биосинтеза, предшествующие данной генетически блокированной реакции, причем промежуточные продукты биосинтеза могут подвергаться дальнейшим биохимическим превращениям. С другой стороны, пути биосинтеза различных метаболитов неразрывно связаны между собой, в силу чего блокирование одной химической реакции часто приводит к изменению скорости других реакций, сопряженных с первой. Таким образом, в результате одной биохимической мутации в процессе биосинтеза данного метаболита может возникнуть очень большое количество всевозможных изменений. Тем не менее, получение ауксотрофных мутантов микроорганизмов оказалось чрезвычайно ценным методом в селекции продуцентов некоторых метаболитов.

Применение специфических методов селекции продуцентов первичных метаболитов очень сильно сокращает длительность и трудоемкость селекционного процесса. На практике последний в ряде случаев ограничивается получением одинарных или двойных биохимических мутантов, обладающих высокой продуктивностью, тогда как для выделения высокоактивных продуцентов вторичных метаболитов (например, антибиотиков) селекционеру приходится осуществлять многие ступени отбора с использованием мутагенных факторов.

В 1956 году был выделен из почвы микроорганизм, получивший видовое название *Micrococcus glutamicus* и обладающий способностью синтезировать в большом количестве глутаминовую кислоту. Этот штамм был отобран из 500 штаммов бактерий, выделенных из почвы и обработанных УФ лучами.

В последующие годы был найден еще ряд бактерий, обладающих способностью синтезировать значительные количества глутаминовой кислоты. Все они обладали некоторыми общими свойствами, в частности все они были биохимическими мутантами, а точнее ауксотрофами по биотину, и в благоприятных условиях ферментации образовывали до 25—30 мг/мл L-глутаминовой кислоты.

Не менее интересными были ауксотрофные мутанты у нескольких видов бактерий — *E. coli*, *Bac. subtilis*, *M. glutamicus*. Как и ожидали,

некоторые из ауксотрофных мутантов приобрели способность выделять в среду значительные количества свободного лизина, причем наилучшими продуцентами оказались мутанты с наследственными нарушениями в цепи превращений аспарагиновой кислоты.

Известно, что аспарагиновая кислота является исходным продуктом для биосинтеза многих аминокислот — метионина, треонина, изолейцина, а также лизина, причем соответствующая биосинтетическая цепь является разветвленной. Раньше других отходит ветвь, заканчивающаяся образованием лизина; две другие ветви приводят соответственно к образованию метионина и треонина с изолейцином. Накопление избыточных количеств лизина в связи с этим происходит во всех тех случаях, когда генетический блок затрагивает любой из этапов биосинтеза метионина, треонина, изолейцина или всех этих аминокислот взятых вместе. Очевидно, что наибольший эффект должно дать генетическое блокирование пути биосинтеза на самом раннем этапе, предшествующем образованию гомосерина, — ключевой аминокислоты для синтеза как метионина, так и треонина. И действительно, наибольшей продуктивностью при синтезе лизина характеризовались ауксотрофные мутанты, недостаточные по гомосерину.

Простой подсчет показывает, что по сравнению с исходным штаммом *M. glutamicus*, который выделяет около 0,1 мг/мл L-лизина, гомосериновые ауксотрофы обладают в 200—300 раз большей продуктивностью. Такое резкое увеличение продуктивности в результате одной биохимической мутации является одним из лучших практических достижений современной генетики микроорганизмов.

В промышленном производстве аминокислот ведущее место занимают три аминокислоты — глютаминовая кислота, метионин и лизин. Только две из них — глютаминовую кислоту и лизин — получают микробиологическим методом (метионин производят методом химического синтеза); тем не менее в арсенале генетики микроорганизмов имеются наготове высокопродуктивные мутанты, обеспечивающие возможность организации крупномасштабного производства и других аминокислот, как только в том появится необходимость.

Любопытна история выведения других штаммов, а именно продуцентов пуриновых соединений. Некоторые микроорганизмы накапливают в питательной среде 0,3—0,5 мг/мл этих соединений, но ни инозиновой, ни ксантозиновой кислоты в сколько-нибудь значительных количествах среди них не обнаружено. Тогда генетики прибегли к методу, блестяще оправдавшему себя в селекции продуцентов аминокислот, — к выделению ауксотрофных мутантов с генетическим блоком в цепи превращений пуринов и их производных. Результаты, которые были при этом получены, еще раз подтвердили важную роль ауксотрофных мутантов в создании продуцентов первичных метаболитов.

Новые перспективы в использовании пуринонедостаточных мутантов микроорганизмов связаны с тем, что производные пуринов являются предшественниками в биосинтезе рибофлавина. Исходя из этого, гене-

тическое блокирование биосинтеза пуринов на ранних этапах может быть использовано для получения мутантов, образующих в избытке рибофлавин.

На примере создания сверхактивных штаммов продуцентов аминокислот и пуриновых соединений можно убедиться в большом значении для получения направленных мутаций сведений, накопленных о генетическом аппарате, контролирующем синтез метаболитов. Активности этих продуцентов, достигающие 30 мг/мл (по лизину) и 50 мг/мл (по глютаминовой кислоте), намного определили многочисленные штаммы продуцентов антибиотиков, из которых активности лучших в результате многолетних селекционных работ достигли, в пересчете на весовое содержание, всего до 10—15 мг/мл (пенициллин, стрептомицин, тетрациклин), и даже 2,5—3,0 мг/мл (олеандомицин, эритромицин).

Было бы несправедливо утверждать лишь о подсобной роли генетики микроорганизмов, пусть даже очень положительной, в развитии микробиологической промышленности. Ведь использование генетики в производстве антибиотиков привело к повышению производительности заводов не на 25% и даже не в 2 или 3 раза, а в десятки и сотни раз. Так, если исходный штамм—продуцент пенициллина синтезировал 20 лет тому назад 100 ед/мл, то современные штаммы синтезируют 10 000—15 000 ед/мл. Такого же резкого повышения продуктивности штаммов достигли генетики почти в отношении всех продуцентов антибиотиков. Если бы не наличие генетических методов, вряд ли «дикари», которые выделены из почвы, могли бы стать основой многотоннажного производства современной антибиотической промышленности.

Еще более решающую роль сыграла генетика в организации производства таких аминокислот, как лизин и глютаминовая кислота. Можно без преувеличения считать, что только достижения генетики создали реальные условия для микробиологического производства этих аминокислот, ибо только приведенные уровни продуктивности биохимических мутантов обеспечили рентабельное производство L-лизина, L-глютаминовой кислоты, инозиновой кислоты и их широкое применение в качестве пищевых и кормовых добавок.

Таким путем успехи в разработке теоретических проблем генетики привели к технической революции, к становлению новой отрасли народного хозяйства — микробиологической промышленности.