

Majority of bones belong to over-aged animals. Sheep in general were large sized and of not less than 56—59 cm height. Females were both hornless and with horns. Goat bones are less numerous than sheep ones. Goats, by the structure of their skull, belong to *Capra prisca* type. They don't differ in size from wild forms of *Capra aegagrus*.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Манасерян Н. У. Биолог. ж. Армения, 25, 10, 1972.
2. Манасерян Н. У. Мат-лы конф. мол. уч., Ереван, 1977.
3. Цалкин В. И. Бюлл. МОИП, биол. 64, вып. 5, 1961.
4. Цалкин В. И. Бюлл. МОИП, вып. 1, 1970.
5. Рухкян А. А. Овцеводство Армянской ССР и пути его качественного улучшения. Ереван, 1948.

«Биолог. ж. Армения», т. 37, № 11, 1984

УДК 579.222.3.253.4

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОТОЛЕРАНТНЫХ МУТАНТОВ MICROCOCCLUS GLUTAMICUS

Н. С. БАБАСЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Получены и изучены термотолерантные мутанты у штамма-продуцента L-лизина *Micrococcus glutamicus* PBP-26. Выявлено, что мутации к термотолерантности приводят к резким изменениям морфофизиологических и биохимических свойств клетки. Отображая мутанты, которые сохранили способность к сверхсинтезу аминокислот и могут служить исходным материалом для селекции высокоактивных термотолерантных штаммов—продуцентов L-лизина и других аминокислот.

*Ключевые слова:* мутанты термотолерантные, биосинтетическая активность, селекция штаммов, лизин, аминокислоты.

Штаммы-продуценты аминокислот, используемые в отечественной микробиологической промышленности, обладают естественной чувствительностью к повышенной физиологической температуре (33—35° и выше). Экзотермические процессы при биосинтезе аминокислот при недостаточном теплоотводе приводят к повышению температуры культуральной жидкости, что снижает выход продукта при его промышленном получении или требует больших затрат воды и электроэнергии для увеличения отвода тепла.

В связи с этим большое значение имеет получение термотолерантных вариантов штаммов-продуцентов аминокислот, пригодных для производства, в условиях обычного теплоотвода.

Целью данной работы было получение и физиолого-биохимическое изучение термотолерантных мутантов у штамма-продуцента L-лизина.

*Материал и методика.* В работе использовали стрептомицинустойчивый штамм-продуцент L-лизина *Micrococcus glutamicus* PBP-26, ауксотрофный по гомосерину и

биотину, и его термотолерантные мутанты [5]. В качестве сред для культивирования исходного штамма-продуцента и его мутантов использовали мясоептонный бульон (МПБ), мясоептонный агар (МПА) и минимальную среду МС [4].

Для получения спонтанных термотолерантных мутантов определенное количество исходной культуры в логарифмической фазе роста после центрифугирования и ресуспендирования в таком же количестве свежего МПБ высевали по 0,2 мл на чашки Петри со средой МПА. Чашки инкубировали в течение 2—3 дней в термостате при 42°. Мутанты тотально отбирали и очищали путем повторных пассажей.

Для получения нитрозогуанидининдуцированных термотолерантных мутантов определенное количество исходной культуры центрифугировали, ресуспендировали в таком же количестве фосфатного буфера, (рН 5,5), содержащего 300 мкг/мл нитрозогуанидина (НГ), и инкубировали на водяной бане при 30° в течение 30 минут. Для прекращения действия НГ культуру разводили охлажденным буфером и отмывали от мутагена двукратным центрифугированием в буфере того же состава. Осадок ресуспендировали в МПБ, инкубировали на качалке при 30° в течение 4—5 ч и высевали по 0,2 мл на чашки Петри со средой МПА. Чашки инкубировали в течение 2—3 дней при 42°. Мутанты тотально отбирали и очищали путем повторных пассажей.

Для проверки потребностей в факторах роста и устойчивости к стрептомицину отдельные колонии мутантов стерильной петлей переносили в лунки штампа, залитые жидкой средой МС. Затем при помощи щетки капли бактериальных суспензий наносили на поверхность чашек с минимальной средой МС, не содержащей факторов роста, и полноценной средой со стрептомицином.

Наличие роста мутантов на минимальной среде без добавок факторов роста и отсутствие его на среде со стрептомицином свидетельствовали об утрате соответственно потребностей в факторах роста и устойчивости к стрептомицину. С целью изучения зависимости проявления исследуемых признаков от температуры мутанты высевали на две чашки с указанными средами и инкубировали при 30° и 42°.

Биосинтетическую активность мутантов проверяли методом ферментации в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл на качалках со скоростью вращения 180 об/мин при 30° в течение 72 часов. В качестве среды для ферментации использовали регламентную среду Чаренцаванского опытно-промышленного завода по производству лигнина. Инокулятом служила водная суспензия клеток мутантов, полученная смывом с агаровых косяков. Количество аминокислот в культуральной жидкости определяли методом хроматографии на бумаге.

*Результаты и обсуждение.* В настоящем сообщении представлены результаты изучения 130 мутантов *Micrococcus glutamicus* РВР-26, представляющих наибольший интерес.

Частота встречаемости спонтанных термотолерантных мутантов составляла  $3,4 \cdot 10^{-12}$ , после обработки нитрозогуанидином— $1,8 \cdot 10^{-8}$ . Большая часть мутантов получена после обработки НГ.

Изучение морфологии и пигментации колоний мутантов показало, что по сравнению с исходной культурой у мутантов наблюдаются изменения. Преобладающее большинство их меняет свою пигментацию от бежевой к бледно-желтой или ярко-желтой. Изучение пигментации колоний при разных температурах показало, что при 30° пигментация интенсивнее, чем при 42°. У ряда мутантов отмечается изменение формы колоний, которое не зависит от температуры культивирования. Данные об изменении формы колоний у спонтанных термотолерантных мутантов приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, у 14 мутантов из 40 в той или иной степени изменена форма колоний. Сходная картина наблюдается у НГ-индуцированных мутантов.

Таблица 1

Изменение формы колоний у спонтанных термотолерантных мутантов

Группы мутантов	Форма колоний	
	30°	42°
I (26 мутант в)	неизменяющаяся	неизменяющаяся
II (8 мутантов)	изменяющаяся	изменяющаяся
III (6 мутантов)	сильно изменяющаяся	сильно изменяющаяся

Изучение температурных границ роста мутантов на синтетической и полноценной средах показало, что верхняя граница роста исходной культуры на полноценной среде составляет 41°, на синтетической—40°, в то время как у мутантов на полноценной среде она составляет 45°, на минимальной—41°.

Исходная культура устойчива к большим дозам стрептомицина. Данные об изменении чувствительности мутантов к 200 мкг/мл стрептомицина приведены в табл. 2, согласно которой большая часть спон-

Таблица 2

Изменение чувствительности к стрептомицину у спонтанных термотолерантных мутантов при разных температурах

Группы мутантов	Рост на полноценной среде			
	без стрептомицина		со стрептомицином	
	30°	42°	30°	42°
Исходная культура	+	—	+	—
I (20 мутантов)	+	+	—	—
II (11 мутантов)	+	+	+	+

Обозначения +—нормальный рост культуры; ——отсутствие роста.

спонтанных термотолерантных мутантов утратила устойчивость к стрептомицину. Сходная картина наблюдается у ИГ-индуцированных мутантов.

У полученных мутантов определяли потребности в факторах роста. Исходный штамм-продуцент L-лизина аукомотрофен по гомосерину и биотину. Большинство термотолерантных мутантов одинаково хорошо растет на минимальной среде МС как с добавками факторов роста, так и без них. Причем потребность в факторах роста утрачивается независимо от температуры инкубирования.

Как видно из табл. 3, у большинства мутантов утрачена потребность в факторах роста.

Изучены также биосинтетические способности термотолерантных мутантов. Выявлена значительная гетерогенность по уровню биосинтеза аминокислот. Мутанты продуцируют лизин, аланин, валин, лейцин, глутаминную и аспарагиновую кислоты.

Потребность в факторах роста у термотолерантных мутантов

Группы мутантов	Рост на полноценной среде		Рост на минимальной среде МС			
			без добавок факторов роста		с добавками факторов роста	
	30°	42°	30°	42°	30°	42°
Исходная культура	+	-	-	-	+	-
I (36 мутантов)	+	+	+	+	+	+
II (4 мутанта)	+	+	-	-	+	+

Обозначения: + — нормальный рост культуры, — — отсутствие роста.

Изучение биосинтетических способностей большого количества термотолерантных мутантов позволило выделить 2 группы мутантов.

Таблица 4

Биосинтетические способности термотолерантных мутантов

Группы мутантов	Биосинтетические способности	Доля активных мутантов, %
1	синтезирующие L-лизин	2,3
2	синтезирующие аланин в разных количествах	97,7

Из данных табл. 4 видно, что только 2,3% термотолерантных мутантов сохранили способность к биосинтезу L-лизина в небольших количествах. В то же время подавляющее большинство мутантов синтезирует значительные количества аланина.

На основании проделанной работы можно заключить, что мутации к термотолерантности приводят к резким изменениям морфофизиологических и биохимических особенностей клетки. Только небольшая часть мутантов сохраняет способность к биосинтезу лизина. У таких мутантов сам процесс биосинтеза остается термочувствительным, и при высокой температуре активность штамма-продуцента направляется на накопление аланина.

Изменение множества признаков при воздействии экстремальных температур было описано и для других организмов [1—3, 6, 7].

Филлал ВНИИгенетика

Поступило 5.III 1984 г.

### MICROCOCCUS GLUTAMICUS-ի ջերմապահուն ֆոնսանսների ԱՆՁՍԱՅՈՒՄԸ ԵՎ ՌԻՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ն. Ս. ԲԱԲԱՅԱՆ, Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Լիզին սինթեզող *Micrococcus glutamicus* PBP-26 շտամից ստացված և ուսումնասիրված են ջերմակայուն մուտանտները: Հայտնաբերված է, որ ջերմակայունություն առաջացնող մուտացիաների հետևանքով տեղի են ունե-

նում բջի մորֆո-ֆիզիոլոգիական և բիոքիմիական հատկությունների կրող փոփոխություններ: Ընտրված են մուտանտներ, որոնք պահպանել են ամինաթթուներ ղերսինթեզելու հատկությունը և կարող են ծառայել որպես ելանյութ՝ բարձր ակտիվությամբ շեմակայուն լիզին և ուրիշ ամինաթթուներ սինթեզող շտամների սելեկցիայի համար:

## ISOLATION AND ANALYSIS OF THERMOTOLERANT MUTANTS OF *MICROCOCCLUS GLUTAMICUS*

N. S. BABASYAN, M. G. CGANESSIAN

Thermotolerant mutants of *Micrococcus glutamicus* strain PBP-26, producing L-lysine, have been isolated and analysed. It has been shown that mutations to thermotolerance lead to sharp changes in morpho-physiological and biochemical properties of the cell. Mutants retaining the ability of amino acid overproduction have been selected. They can be used as an initial material for the selection of highly active thermotolerant strains, producing L-lysine and other amino acids.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура. Л., 1975.
2. Имишенецкий А. А., Кондратьева Т. Ф., Смутко А. Н. Микробиология, 50, 3, 471—475, 1981.
3. Кишковская С. А., Бурьян Н. И. Микробиология, 49, 1, 156—160, 1980.
4. Клаус Р., Хейс У. Сборник методик по генетике микроорганизмов, М., 1970.
5. Оганесян М. Г., Барегамян И. Н. Сб.: Тезисы докладов юбилейной сессии, посвященной 60-летию установления Советской власти в Армении, 60. Ереван, 1980.
6. Шкидченко А. И., Малишевская Л. В., Никитин В. А. Микробиол. ж., 43, 1, 23—29, 1981.
7. Kats D. S., Sobleski R. J. Trans. Kans. Acad. sci. 83, 91—94. 1980.

«Биолог. ж. Армении», т. 37, № 11, 1984

УДК 612.826+612.825

## ГЛУБИННЫЕ СТРУКТУРЫ МОЗГА И МОТИВАЦИЯ

А. А. ГАРИБЯН

Повреждение глубинных структур мозга (палео-, неостриатума, люисова тела, черной и безымянной субстанций, гиппокама, миндаля) приводит к кратковременному угнетению пищевой мотивации.

Повреждение красного ядра этого явления не вызывает.

Ключевые слова: мотивация, глубинные структуры, условные рефлексы.

Мотивация является первым и основным фактором формирования афферентного синтеза [10]. Без нее не может образоваться ни одна