

26. Ilyin Yu. V., Tchurikov N. A., Ananiev E. V., Ryskov A. P., Yenikolopov G. N., Limborska S. A., Mateeva N. E., Gvozdev V. A., Georgiev G. P. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42, 959—969, 1978.
29. McKintock B. The control of gene action in maize. Brookhaven Sympos. Biol., 18, 145—152, 1965.
30. Rubin G. M. In: Mobile Genet., Elements (ed. Shapiro J. A.), N. Y. Acad. Press, 329—361, 1983.
31. Spradling A. G., Rubin G. M. Science, 218, 341—353, 1982.
32. Shimotohno K., Temin H. M. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 45, 719—731, 1981.
33. Tatosyan A. G., Nabirochkin S. D., Gazaryan K. G., Kisselev F. L. Nature, 311, 394—395, 1984.
34. Thompson J. N., Woodruff R. C. Heredity, 43(3), 327—335, 1951.

Поступило 12 II 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 861—864, 1986

УДК 579.6:577.1

ОТБОР И ИЗУЧЕНИЕ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ У *SERRATIA MARCESCENS* АМК-Р103. ПРОДУЦЕНТА L-ВАЛИНА

А. О. АРМАНДЖЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — У аналогорезистентного мутанта *Serratia marcescens* АМК-Р103 нитрозогуанидин-индуцированным мутагенозом были получены ауксотрофные мутанты с частотой 10^{-3} . Изучали влияние ауксотрофных мутаций на продуктивность L-валина исходного регуляторного АМК-Р103 штамма. Установлено, что потребность в изолейцине у двух мутантов приводит почти к двукратному увеличению накопления L-валина в культуральной жидкости.

Վանութիւն — նիտրոզոգուանիդինով յակածված մուտացիոնների պայմաններում *S. marcescens* АМК—Р 103 շտամի մոտ ստացվել են աուքսոտրոֆի մուտանտներ 10^{-3} հաճախակայանությամբ: Ուսումնասիրվել է աուքսոտրոֆ մուտացիաների ազդեցութիւնը АМК—Р 103 շտամի L-վալին արտադրելու ունակության վրա: Փարզվել է, որ երկու մուտանտների մաս իրար չէջիների նկատմամբ ունեցած պահանջը արագ է բնիկ վալին սինթեզելու ունակության կրկնակի ավելացում:

Abstract — Auxotroph mutants were selected with the frequency of 10^{-3} in analogue-resistant mutant of *S. marcescens* АМК—Р 103 of nitroso-guanidine-induced mutagenesis. The influence of auxotroph mutation on L-valine producing activity of АМК—Р 103 strain was investigated. It was detected that in the two mutants the isoleucine-auxotrophy led to two-fold increase of L-valine accumulation in the cultural medium.

Ключевые слова: мутант, нитрозогуанидин, валин, продуцент, аминокислота.

Вовлечение новых микроорганизмов в аминокислотное производство требует разработки методов селекции с учетом особенностей регуляции активности генов, контролирующих биосинтез аминокислот у данных микроорганизмов.

Валин — одна из незаменимых аминокислот, биосинтез которой связан с метаболическими путями аминокислот семейства аспарагиновой

(гомосерин, треонин, метионин) и пировиноградной кислот (изолейцин, лейцин) и нередко катализируется общими ферментами. Исходя из этого, можно предположить, что получение ауксотрофных мутаций по сопряженным аминокислотам может привести к успешному синтезу валина. Так, например, полученные у *Corynebacterium glutamicum* изолейцинедефицитные мутанты оказались сверхсинтетиками валина [10].

Ранее сообщалось, что регуляторные аналогрезистентные мутанты *Serratia marcescens* накапливают в культурной жидкости (КЖ) значительные количества валина и лейцина, а мутации к ауксотрофности (в частности, изолейцину) приводят к увеличению синтеза валина регуляторными мутантами *S. marcescens* [1, 2].

В настоящей работе приводятся данные о влиянии мутаций к ауксотрофности на способность регуляторного мутанта *S. marcescens* АМК-Р103 накапливать валин в КЖ.

Материал и методика. Объектом исследований был штамм *S. marcescens* АМК-Р103, синтезирующий значительное количество валина. Штамм АМК-Р103 получен из дикого штамма *S. marcescens* ATCC 9986 с помощью УФ-индуцированного мутагенеза как мутант, устойчивый к DL- α -аминомасляной кислоте [3]. Ауксотрофные мутанты получены обработкой N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидином в концентрации 100 мкг/мл в нитратном буфере (рН 5,5) в течение 30 минут. Отбор мутантов проводили по Ледербергу [9]. Потребности в факторах роста определяли по Холлидею [8].

Питательными средами для выращивания бактерий служили мясопептонный бульон и минимальная среда Девиса [7]. Основную минимальную среду для идентификации ауксотрофных мутантов готовили на основе среды Девиса с добавлением необходимых факторов роста: аминокислот, азотистых оснований, витаминов. Среды уплотняли добавлением агар-агара. В качестве ферментационной среды служила модифицированная среда Кисеми [12].

Способность ауксотрофных мутантов к накоплению аминокислот определяли после ферментации в колбах. Содержание аминокислот в КЖ определяли методом бумажной хроматографии в системе II-бутанол—вода—уксусная кислота (4:5:1). Проявителем служил пингидрин. Пятна элюировали в системе этанол—вода—хлористый кадмий. Количество аминокислот определяли колориметрически по предварительно построенным калибровочным кривым [4, 5].

Результаты и обсуждение. Метод отбора штаммов *S. marcescens*, продуцирующих L-валин, основан на получении мутантов, устойчивых к структурному анализу изолейцина DL- α -аминомасляной кислоте [3, 6, 11]. Полученные АМК-Р мутанты, устойчивые к 10 или 20 мг/мл DL- α -аминомасляной кислоте, синтезируют значительное количество валина. Мутант АМК-Р103 накапливал в КЖ более чем 10 г/л L-валина. С целью повышения выхода валина у этого регуляторного штамма с помощью нитрозогуанидин-индуцированного мутагенеза были получены ауксотрофные мутанты.

В пяти независимых опытах было выделено и идентифицировано по Холлидею 220 ауксотрофных мутантов, классифицированных затем по потребностям в факторах роста (табл. 1).

Среди ауксотрофов чаще встречались мутанты, нуждающиеся в гистидине, метионине, лизине, лейцине, изолейцине, тиамине, глутаминовой кислоте, цистине, треонине, тогда как ауксотрофы по пролину, триптофану, валину, аденину, тирозину, серину встречались реже.

Таблица 1. Классификация ауксотрофных мутантов *S. marcescens* АМК-Р103 по потребностям в факторах роста

Класс ауксотрофных мутантов	Количество мутантов	Доля, %	Число типов мутаций в данном классе
Моноауксотрофы	86	40	19
Диауксотрофы	37	16.8	13
Полиауксотрофы	12	5.5	7
Неидентифицируемые	83	37.7	?
Всего	220	100	39

Из всех полученных ауксотрофных мутантов особый интерес с точки зрения сверхсинтеза валина вызвали ауксотрофы, нуждающиеся в изолейцине, лейцине, валине или во всех трех аминокислотах одновременно.

Влияние ауксотрофных мутаций на биосинтетическую активность исходного АМК-Р штамма определяли в условиях колбочной ферментации. Усредненные результаты серийных ферментаций приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние ауксотрофных мутаций на биосинтез L-валина у штамма *S. marcescens* АМК-Р103

Наименование культуры	Фенотип	Накопление валина, %	Накопление лейцина, г/л
Исходный штамм АМК-Р 103	abu ^K прототроф	100	ни*
Л-147	abu ^R , leu ⁻	11	ни
Л-152	abu ^R , leu ⁻	18	ни
Л-154	abu ^R , leu ⁻	7	ни
Л-186	abu ^R , leu ⁻	сл*	ни
Л-188	abu ^R , leu ⁻	13	ни
Л-229	abu ^R , leu ⁻	сл	ни
И-112	abu ^R , ile ⁻	175	ни
И-127	abu ^R , ile ⁻	165	ни
И-189	abu ^R , ile ⁻	107	1.0
И-192	abu ^R , ile ⁻	115	1.0
И-207	abu ^R , ile ⁻	119	сл
И-216	abu ^R , ile ⁻	103	сл
И-165	abu ^K , ile ⁻	111	ни
В-127	abu ^R , val ⁻	ни	ни
В-230	abu ^R , val ⁻	ни	ни
ИВА-108	abu ^K , ile ⁻ , val ⁻ , leu ⁻	ни	сл
ИВА-184	abu ^K , ile ⁻ , val ⁻ , leu ⁻	ни	сл
ИВА-160	abu ^K , ile ⁻ , val ⁻ , leu ⁻	ни	сл
ИВА-253	abu ^R , ile ⁻ , val ⁻ , leu ⁻	ни	сл

Обозначения: сл*—следовые количества; ни—не накапливается.

Установлено, что потребность в лейцине приводит к снижению валинпродуцирующей активности исходной культуры до следовых количеств. Потребность в изолейцине у двух мутантов (И-112, И-127) приводит почти к двукратному увеличению биосинтеза валина. Естественно, потребность в валине и валин+лейцин+изолейцине приводит к полному блокированию биосинтеза валина.

Из приведенных результатов следует, что мутации по генам, контролирующим биосинтез аминокислот, с разветвленной цепью (валин, лейцин, изолейцин), по-разному влияют на процесс биосинтеза валина и что мутации, обуславливающие потребность в изолейцине, могут быть использованы для селекции активных продуцентов валина у штамма *S. marcescens*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Армаджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 4, 339—342, 1981
2. Армаджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 6, 476—480, 1981.
3. Армаджян А. О., Оганесян М. Г. Биолог. ж. Армении, 37, 9, 735—740, 1984.
4. Кара-Мурза С. Н., Тимохина Е. А., Жданова Н. И. Прикладная биохимия и микробиология, 17, 6, 813—819, 1981.
5. Хейс Н. М., Мацек К. Хроматография на бумаге. М., 1962.
6. Croctant F., Emeraldi O., Mateurz D. Eur. J. Appl. Microbiol., 4, 3, 177—179, 1977.
7. Davis B. D., Mignoli E. S. J. Bacteriol., 60, 17—28, 1950.
8. Holliday R. Nature, Lond., 3, 987, 1956.
9. Lederberg J., Lederberg E. J. Bacteriol., 62, 3, 399, 406, 1952.
10. O. Nakayama K., Kidudu S., Kizoshita S. J. General, and Appl. Microbiol., Tokyo, 7, 52, 1961.
11. Kizumi M., Komatsubara S., Chibata J. J. Bacteriol., 106, 493—499, 1971.
12. Kizumi M., Kato L., Komatsubara S., Chibata J. Genetics of industrial microorganisms, 1, Bacteria, Amsterdam, 267—267, 1973.

Поступило 2.IX 1985 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 864—869, 1986

УДК 577.5:579.253

СУПРЕССИЯ СВЕРХСИНТЕЗА КАПСУЛЯРНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ФАГОУСТОЙЧИВЫМИ МУТАЦИЯМИ У *LON⁻* ШТАММОВ *E. COLI K-12*

Гар. Г. ОГАНЕСЯН, А. А. БАРСЕГЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН
Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Аннотация — С помощью бактериофага M59, лизирующего капсулированные клетки, получены нествлзистые мутанты у *lon⁻* штамма *E. coli K-12* с частотой 10^{-2} . Показано, что нествлзистый фенотип мутантов связан с жизнеспособным вытением супрессорных мутаций, трансдуцирующихся с гистидиновым геном с частотой 30—40%, и локализованных на 45-й мини генетической карте.

Մանուկյան — M59 բակտերիոֆագի օգնությամբ, որը լիզոլի է կոնսուլիանտ (կոնսուլիանտ) *E. coli K-12* բջջերը, ներգրվել է 10^{-2} հաճախությամբ ստացվել *lon⁻* — բջջի շրջանաճանաչ ճանաչանքը ճայլ է արվել, որ ճանաչանքի ոչ լոն-