

ՀՈՂՈՍՆԵՐ - СТАТЬИ

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 10, 799—807, 1987

УДК 663:1.577.112.388.2

ПРОСТЫЕ КРИТЕРИИ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ

Э. М. АКОПЯН, Б. П. КАРАБЕКОВ, В. Е. АКСЕНОВСКАЯ,
Л. С. КАЗАРЯН, Ж. В. КАРАПЕТАН

Научно-исследовательский технологический институт аминокислот, Ереван

Аннотация—Предлагаются простые критерии выявления активности штаммов-продуцентов биологически активных веществ и идентификации штаммов-продуцентов. Критерии были применены к трем штаммам-продуцентам L-пролина.

Անոտացիա— Առաջարկվում են կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի շտամ-պրոդուցենտների ակտիվության բացահայտման և նրանց իդենտիֆիկացիայի պարզ չափանիշները: Զախանիշները կիրառվել են L-պրոլինի երեք շտամ-պրոդուցենտների նկատմամբ:

Abstract—Simple criteria for revealing activity of strains producing biologically active substances and identifying of producing strains are offered. The criteria have been applied to three L-proline producing strains.

Ключевые слова: микроорганизмы, активность штаммов-продуцентов, идентификация штаммов-продуцентов.

Одним из основных критериев, предъявляемых микробиологической промышленностью к штаммам-продуцентам аминокислот, является высокая активность в возможно более широком диапазоне изменения условий ферментации. Среди мутантов *Brevibacterium flavum*, дефективных по синтезу различных аминокислот, наибольшую активность синтеза L-пролина проявляют ауксотрофы (ile^-) [5]. У мутантов ile^- на выход L-пролина существенное влияние оказывает концентрация изолейцина (ile^-), добавленного в питательную среду.

Для нас практический интерес представляло выявление наиболее продуктивного штамма-продуцента L-пролина из мутантов *B. flavum*—AP-111, AP-112 и AP-113, полученных в НИТИА.

Исследовали синтез перечисленных штаммов-продуцентов L-пролина к 72 часу после начала культивирования в зависимости от концентрации Π_e , введенного в питательную среду, содержащую 11% или 15%-ную концентрации сахарозы. Концентрацию Π_e в экспериментах парировали от 0 до 300 мкг/мл (0, 50, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300) для 11%-ной и от 50 до 250 мкг/мл (50, 100, 150, 200, 250) для 15%-ной концентрации сахарозы в питательной среде, разработанной в НИИНА.

Процесс выявления перспективных штаммов-продуцентов и их идентификации затрудняется тем, что от эксперимента к эксперименту трудно с высокой точностью сохранять постоянство параметров культивирования, исходной концентрации посевного материала, его физиологического состояния, распределения клеток по возрасту [4], а также концентрации и состояние компонентов среды и т. д. В данном исследовании предлагаются простые критерии количественной оценки активности штаммов-продуцентов биологически активных веществ (БАВ), а также критерии их идентификации. В предлагаемые критерии количественной оценки штаммов мы вводили не фиксированные параметры, а интервалы изменения их значений, т. е. некоторые интегральные характеристики.

С каждым штаммом-продуцентом были поставлены 4 эксперимента, и каждый из них ставился в 3—4 повторностях. Оптическую плотность (ОП) определяли на ФЭК-50 ИМ. Во всех экспериментах концентрации L-пролина (ρ/λ) и ОП от концентрации сахарозы и Π_e в среде была неустойчивой.

Интегральная активность штаммов-продуцентов L-пролина и их интегральная ОП определяются соотношением:

$$P_{i_1, i_2} = \sum_{i_1=1}^{m_1+1} \sum_{i_2=1}^{m_2+1} \left(\frac{1}{\Pi_{i_1, i_2}} \cdot \sum_{j=1}^{n_{i_1, i_2}} P_{i_1, i_2}(j) \right), \quad (1)$$

где i_1 и i_2 — параметры, характеризующие соответственно фиксированные значения концентрации сахарозы и Π_e в питательной среде, а $m_1 + 1$ — число исходных концентраций сахарозы ($r=1$) и Π_e ($r=2$) в питательной среде, $P_{i_1, i_2}(j)$ — концентрация L-пролина или значение ОП в j -ом эксперименте при i_1, i_2 , т. е. при фиксированных уровнях сахарозы и Π_e соответственно, n_{i_1, i_2} — количество экспериментов, проведенных при i_1 и i_2 . По соотношению (1) вычислены и приведены в табл. 1 средние значения интегральных активностей и ОП штаммов-продуцентов L-пролина в зависимости от различных интервалов концентрации Π_e . Например, значение 134, 227 в табл. 1 соответствует сумме значений концентрации L-пролина в интервале 100—250 мкг/мл при 11%-ной концентрации сахарозы в питательной среде для штамма AP-111, а 1,843 — интегральное значение ОП, также вычисленное по соотношению (1).

По приведенным интегральным критериям можно выбрать наиболее перспективные штаммы и количественно оценить их преимущество. Результаты сравнительного анализа штаммов-продуцентов L-пролина приведены в табл. 2, из которой видно, что при 11%-ной концентрации сахарозы в питательной среде для всех рассмотренных интервалов значений концентраций Π_e синтез L-пролина штаммом AP-112 на 5,52—16,36% выше синтеза L-пролина штаммом AP-111, при этом ОП

Таблица 1. Усредненные интегральные активности штаммов-продуцентов L-пролина и интегральные значения ОП в зависимости от интервалов концентраций изолейцина

Интервалы концентрации изолейцина, мкг/мл	Концентрация сахарозы в среде, %	Интегральная активность Интегральная ОП		
		Штаммы		
		AP-111	AP-112	AP-113
50÷200	11	$\frac{147.459}{1.882}$	$\frac{155.588}{1.209}$	$\frac{146.294}{1.116}$
	15	$\frac{159.452}{1.339}$	$\frac{200.310}{1.028}$	$\frac{175.420}{0.864}$
100÷250	11	$\frac{134.227}{1.843}$	$\frac{156.180}{1.301}$	$\frac{160.646}{1.161}$
	15	$\frac{162.609}{1.422}$	$\frac{227.788}{1.122}$	$\frac{211.342}{1.159}$
100÷200	11	$\frac{119.627}{1.402}$	$\frac{138.279}{0.945}$	$\frac{127.680}{0.951}$
	15	$\frac{137.319}{1.074}$	$\frac{182.763}{0.833}$	$\frac{159.611}{0.777}$
50÷250	11	$\frac{158.509}{2.323}$	$\frac{173.400}{1.565}$	$\frac{179.200}{1.628}$
	15	$\frac{181.743}{1.687}$	$\frac{245.080}{1.317}$	$\frac{237.080}{1.246}$

штамма AP-112 на 29,41—35,76% меньше ОП штамма AP-111. На среде, содержащей 15%-ную сахарозу, преимущество штамма AP-112 по сравнению со штаммом AP-111 увеличивается. В этом случае синтез L-пролина повышается от 25,624 до 40,083%, а ОП при этом уменьшается на 21,05—23,26%. Штамм AP-113 также имеет преимущество перед штаммом AP-111 как при 11%-ной, так и при 15%-ной концентрации сахарозы в среде. Очевидно также некоторое преимущество штамма AP-112 перед AP-113 при обеих концентрациях сахарозы. В табл. 2 знак минус при 18,49 означает, что интегральная ОП штамма AP-113 на среде с 15%-ной концентрацией сахарозы меньше на 18,49%, чем у AP-111 в интервале 100—250 мкг/мл, при одновременном превышении на 36,119% интегральной активности пролинового штамма AP-113 по сравнению с AP-111. Из табл. 3 видно, что все рассмотренные штаммы-продуценты в среде с 15%-ной концентрацией сахарозы более интенсивно синтезируют L-пролин при одновременном уменьшении ОП по сравнению с ОП этих же штаммов, выращенных на питательной среде с 11%-ной концентрацией сахарозы. В табл. 4 данное преимущество более очевидно. Так, удельная активность пролина на единицу ОП для всех штаммов увеличивается минимум на 50%.

Таблица 2. Сравнение усредненной интегральной активности штаммов-продуцентов *L*-пролина и усредненной интегральной ОП в зависимости от концентрации изолейцина, %

Интервалы концентраций изолейцина, мкг/мл	50±200		100±250		100±200		50±250	
	11	15	11	15	11	15	11	15
Концентрация сахарозы в среде, %								
Штамм АР-112	$\frac{5.52}{-35.76}$	$\frac{25.62}{-23.26}$	$\frac{16.36}{-29.41}$	$\frac{40.08}{-21.05}$	$\frac{15.59}{-32.62}$	$\frac{33.09}{-22.47}$	$\frac{9.45}{-32.63}$	$\frac{32.66}{-21.89}$
Штамм АР-113	$\frac{-0.79}{-40.70}$	$\frac{10.04}{-35.47}$	$\frac{19.68}{-20.56}$	$\frac{36.12}{-18.49}$	$\frac{6.73}{-32.19}$	$\frac{16.24}{-27.64}$	$\frac{13.09}{-29.92}$	$\frac{28.33}{-26.13}$
(за 100% принимаются данные по штамму АР-111)								
Штамм АР-112	$\frac{6.35}{8.33}$	$\frac{14.19}{18.90}$	$\frac{2.78}{-11.13}$	$\frac{2.92}{-3.13}$	$\frac{8.30}{-0.63}$	$\frac{14.51}{7.14}$	$\frac{-3.32}{-2.67}$	$\frac{3.37}{5.74}$

(за 100% принимаются данные по штамму АР-113)

Таблица 3. Усредненные интегральные активности штаммов-продуцентов *L*-пролина и интегральные значения ОП для сред с 15- и 11%-ной концентрацией сахарозы, %

Интервалы концентраций изолейцина, мкг/мл	Штаммы		
	AP-111	AP-112	AP-113
50 ÷ 200	8.13	28.74	19.91
	-28.82	-14.97	-22.40
100 ÷ 250	21.14	45.85	37.78
	-22.86	-13.72	-20.85
100 ÷ 200	14.80	32.17	25.01
	-23.39	-11.85	-18.24
50 ÷ 250	16.55	41.26	32.26
	-27.39	-15.82	-23.46

(За 100% принимаются данные по штаммам-продуцентам, выращенным на средах, содержащих 11%-ную концентрацию сахарозы).

Таблица 4. Удельная активность штаммов-продуцентов *L*-пролина на единицу ОП в средах с 15- и 11%-ной концентрацией сахарозы.

Интервалы концентраций изолейцина, мкг/мл	AP-111	AP-112	AP-113
50 ÷ 200	1.1.92%	151.41%	154.79%
100 ÷ 250	157.05%	169.04%	174.07%
100 ÷ 200	149.84%	149.93%	152.91%
50 ÷ 250	160.52%	167.81%	172.80%

(За 100% принимается удельная активность штаммов-продуцентов, выращенных на средах, содержащих 11%-ную концентрацию сахарозы).

Таким образом, обилие сахарозы в некотором смысле «подавляет» рост культуры штаммов-продуцентов при одновременном усилении процесса синтеза пролина клетками. Данная взаимосвязь, по-видимому, имеет глубокий смысл, так как при сравнении штаммов AP-111, AP-112 и AP-113 видно, что при 15%-ной концентрации сахарозы в зависимости от *ile* штамм AP-111, характеризующийся наиболее интенсивным ростом, имеет наименьшую продуктивность, а штаммы AP-112 и AP-113 с менее интенсивным ростом биомассы, в зависимости от *ile*, имеют более высокую активность пролина (рис. 1 а, б).

Для общего случая интегральных оценок штаммов-продуцентов БАВ и произвольного числа параметров соотношение (1) примет вид:

$$P_{i_1, \dots, i_R} = \sum_{i_1=1}^{m_1+1} \sum_{i_2=1}^{m_2+1} \dots \sum_{i_{R-1}=1}^{m_{R-1}+1} \sum_{i_R=1}^{m_R+1} \left(\frac{1}{n_{i_1, \dots, i_R}} \cdot \sum_{j=1}^{n_{i_1, \dots, i_R}} P_{i_1, \dots, i_R} \right). \quad (2)$$

Данное соотношение можно использовать для определения интегральных характеристик любого параметра штаммов-продуцентов БАВ на фоне изменения остальных параметров в известных пределах. Данное

полученные при помощи соотношения (2), можно также использовать для экономической оценки процесса синтеза различными штаммами при различных режимах.

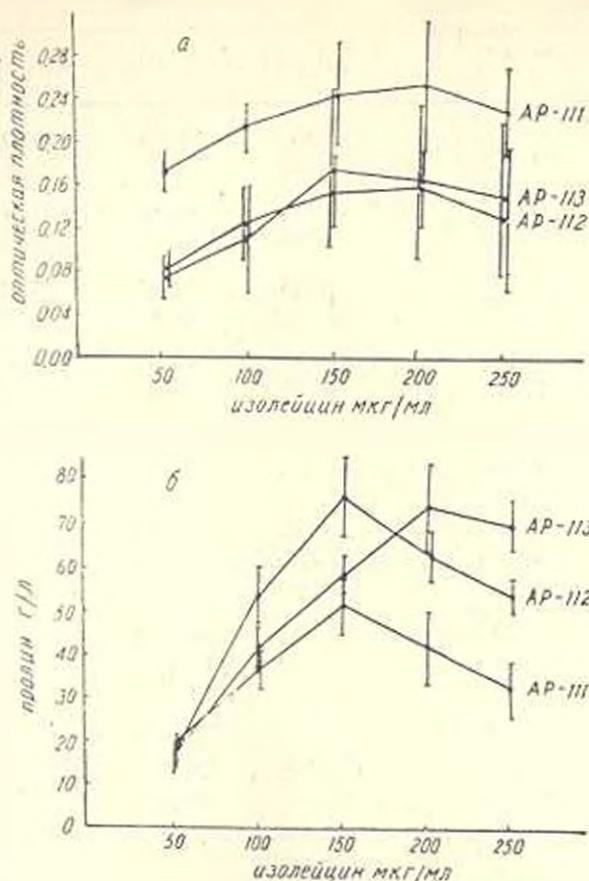


Рис. 1. Усредненная зависимость концентрации L-пролина (а) и ОП (б) от концентрации изолейцина при 15%-ной концентрации сахарозы в питательной среде с границами 95%-ных доверительных интервалов для различных штаммов.

Соотношение (2) можно модифицировать введением в него вероятностных характеристик, что позволит оценить степень правдоподобия результатов, полученных при помощи этого соотношения.

Для микробиологии и микробиологической промышленности идентификация штаммов-продуцентов БАВ имеет существенное значение. В настоящее время используются различные биохимические признаки, отражающие состав и специфику клеток [1]. Делаются также попытки проводить таксономические исследования микробных культур с помощью ИК-спектроскопии [2, 3].

Мы предлагаем более простую методику идентификации штаммов-продуцентов, апробированную на штаммах AP-111, AP-112 и AP-113, по минимальному числу параметров культуры: ОП, активности L-пролина, концентрации изолейцина и сахарозы, внесенных в питательную среду. Для оценки близости (средства) штаммов предлагается соотношение:

$$I_{A, B} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \sqrt{\sum_{j=1}^n (a_{i,j} - b_{i,j})^2} \quad (3)$$

где $a_{i,j}$ и $b_{i,j}$ — значения i -го параметра, снимаемых с j -ой точки условно дискретизированных процессов, соответственно для штаммов А и В. Ясно, что чем меньше $I_{A, B}$, тем больше сходство между штаммами. В данном случае дискретизация производилась по изолейцину.

А для трехмерного случая, т. е. для идентификации штаммов AP-111, AP-112 и AP-113 по ОП, активности L-пролина и ile при 11- и 15%-ной концентрациях сахарозы в питательной среде использовалось соотношение:

$$I_{AP-112, AP-113} = \frac{1}{9} \sum_{i=1}^9 \sqrt{\sum_{j=1}^3 (a_{i,j} - b_{i,j})^2} \quad (4)$$

где $a_{i,j}$ и $b_{i,j}$ — значения ОП соответственно для штаммов AP-112 и AP-113 в j -ой точке кривой; a_2 и b_2 — концентрации ile в питательной среде; a_3 и b_3 — концентрации L-пролина. При трехмерном случае величина $I_{AP-112, AP-113}$ равна усредненному расстоянию между соответствующими точками двух кривых исследуемых штаммов-продуцентов. Графическое представление в трехмерном пространстве благодаря наглядности позволяет выявлять те специфические характеристики штаммов-продуцентов, которые не могут быть обнаружены при использовании соотношений (3) или (4). Например, случай, когда усредненная удаленность точек кривых двух штаммов-продуцентов относительно третьей равна, а пространственное расположение этих кривых может принципиально отличаться. На рис. 2а, б видно, что кривая штамма AP-113 по пространственному расположению принципиально отличается от соответствующих кривых штаммов AP-111 и AP-112. Сходство между приведенными кривыми штаммов AP-111 и AP-112 отражает их относительную физиологическую близость, так как AP-111 и AP-112 получены из одного и того же штамма путем одиночных мутаций, а AP-113 был получен из AP-112 путем дополнительной мутации. Следовательно, для выявления степени сродства штаммов-продуцентов необходимо не только учитывать минимальные значения величины $I_{AP-112, AP-113}$, но и «подобие» кривых (рис. 2, а, б).

Таким образом, в дальнейшем целесообразно изучить вопрос о стабильности пространственного расположения кривых с целью определения вида штаммов по их пространственным характеристикам. Если с культуры клеток снимались p параметров, то для выявления специфических трехмерных характеристик необходимо построить C_n^3 трехмерных кривых, где C_n^3 — число сочетаний из p по 3, а затем из них отобрать наиболее информативные для данного штамма. Если требуется провести исследования по идентификации неизвестного штамма-продуцента В с известным «эталонным» штаммом А, то прежде всего следует снять с исследуемой культуры В параметры, являющиеся информативными для «эталонной» культуры А. Затем следует определить $I_{A, B}$ и при малом значении его сравнить также и пространственное расположение информативных кривых. И только после установления подобия

кривых штаммов А и В можно сделать вывод о идентичности штаммов-продуцентов А и В.

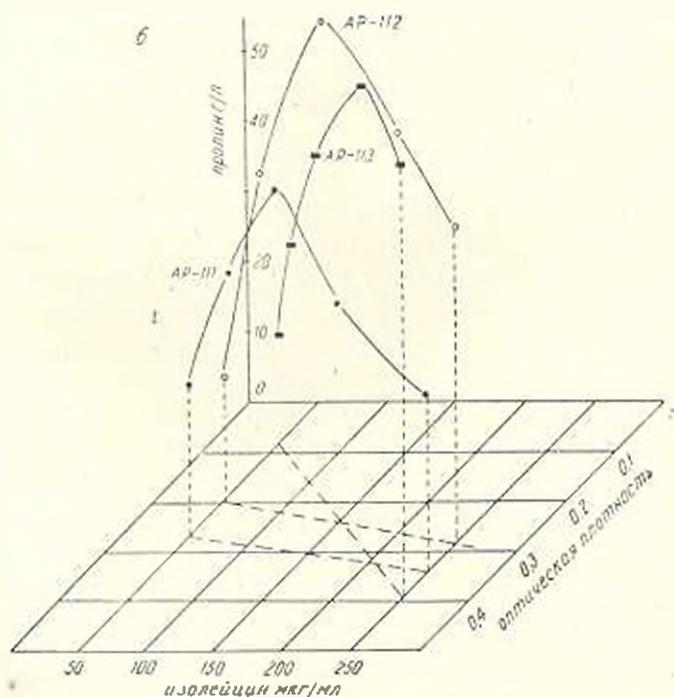
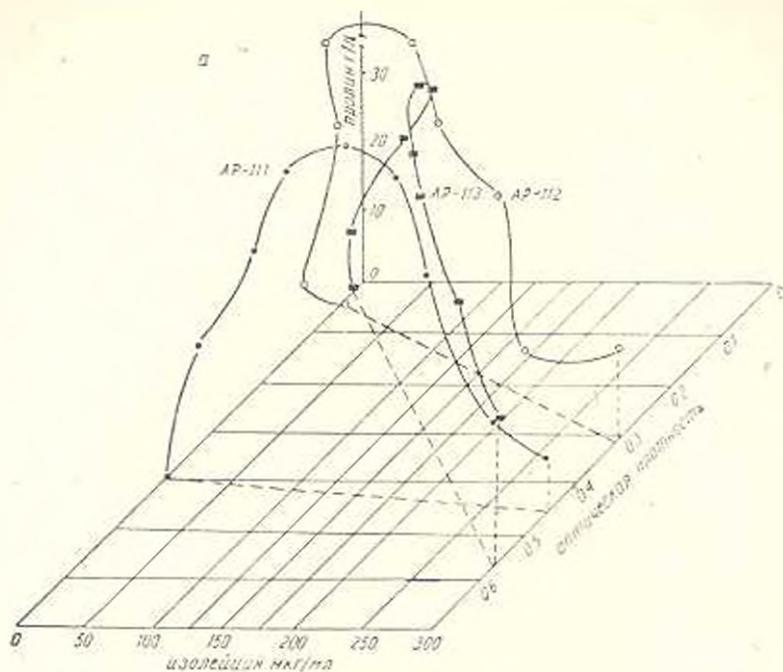


Рис. 26. Зависимость концентрации L-пролина от ОП и концентрации изолейцина в трехмерном пространстве для 11- (а) и 15%-ной концентрации сахарозы в среде для различных штаммов.

В заключение отметим, что предлагаемые критерии количественной оценки активности штаммов-продуцентов биологически активных веществ и идентификации этих штаммов просты и могут быть применены как в исследовательской практике, так и в промышленности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агоя Н. С., Калуцкий Л. В. В кн.: Успехи микробиологии. 9, 59—107, М., 1972.
2. Загребя Е. Д., Эддус Я. А., Якобсон Ю. О. В кн.: Биохимические и физиологические свойства микроорганизмов 124—139. Рига, 1975.
3. Загребя Е. Д. и др. В кн.: Влияние условий культивирования на активность продуцентов. 174—180. Рига, 1980.
4. Капирян Л. С. Автореф. канд. дисс., 22. Пушкино, 1984.
5. Келешян С. К., Карапетян Ж. В., Арушанян А. В., Кочирян Ш. М. Тез. докл. III Всесоюз. совещ. по аминокислотам, 18. Ереван, 1984.

Поступило 12.VI 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 10, 807—811, 1987

УДК 577.323

РАСТВОРИМОСТЬ НУКЛЕОЗИДОВ В РАСТВОРАХ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПЕЧЕНИ КРЫСЫ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН, И. А. ГУКАСЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация.—Изучалась растворимость нуклеозидов при наличии и отсутствии в растворах ДНК-связывающих белков плазматической мембраны печени крысы. Особое внимание уделено белковой фракции, вызывающей значительное увеличение термостабильности и изменение формы дифференциальных кривых плавления ДНК. Величины свободной энергии переноса гуанозина, аденозина, тимидина в белковые растворы из безбелковых не превышают $\pm 200 \frac{\text{кал}}{\text{моль}}$. Перенос тимидина оказался термодинамически невыгодным. Как значения свободной энергии, так и большое различие в энтропийных и отрицательные величины энтропий переноса свидетельствуют о важной роли гидрофобных взаимодействий и о специфичности действия белка на нуклеозиды.

Անոտացիա — Առուժնաբերժամ են նուկլեոզիդները հիդրատացիայի առանձնա- նատկութիւնները ԳՆԲ-ի հետ կապուող սպիտակուցների ներկայութիւմը և բացա- կայութիւմը: Սպիտակուցները անլուծելի են ածխաջրի քրոմատոգրաֆիայի եղա- նակով առեւանների լայնորէ պլազմատիկ մեմբրաններէջ: Նուկլեոզիդների անկա- փոխման թերմոզինամիկական պարամետրերի մեմբրանների քննարկումը բերում է այն եզրակացութիւն, որ սպիտակուցի և նուկլեոզիդների միջև գոյութիւն ունի հիդրոֆոբ յօտեւանութիւն:

Տարբեր նուկլեոզիդների վրա անտրոպիկ սպիտակուցը հանգնա է բերում սպե- ջիֆիկացում: