

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ФАГОРЕЗИСТЕНТНЫХ
МУТАНТОВ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ЛИЗИНА
BREVIBACTERIUM LACTOFERMENTUM ПИТИА-88

М.Б.ЧИГЧЯН, С.В.КАЖОЯН, Г.Г.ОГАНЕЗОВА, Э.Л.АГАБЕКЯН,
Н.А.ОГАНЕСЯН, Н.С.АВЕТИСЯН

НИИ "Биотехнология", ООО "Фармател", 375056, г. Ереван

Коринеформные бактерии - фагорезистентные мутанты - лизин

Микробиологическое производство с использованием высокоактивных бактериальных штаммов - продуцентов является одним из основных способов крупнотоннажного получения незаменимой аминокислоты - лизина, широко применяемого в сельском хозяйстве, медицине, пищевой промышленности.

На заводах по производству лизина в странах СНГ используются коринеформные штаммы - продуценты *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*.

Известно, что чувствительность коринеформных бактерий к бактериофагам может являться причиной фаголизиса бактериальных клеток в процессе ферментации. Фаголизис при производстве аминокислот впервые был отмечен в Японии при получении глутаминовой кислоты с использованием штамма *B. lactofermentum* [5]. В странах СНГ при производстве лизина с использованием штаммов *C. glutamicum*, *B. flavum*, *B. lactofermentum* также обпаруживались фаголизисные операции.

Во всех исследованных случаях фаголизиса наблюдалось замедление процесса биосинтеза, снижение титра клеток и выхода продукта, а при сильном фаговом заражении - полный лизис бактериальных клеток на протяжении логарифмической фазы роста. В начальном периоде ферментационные процессы, зараженные фагом, характеризуются также замедлением потребления сахара, изменениями рН и т.д. [3].

Существуют различные способы борьбы с фаголизисом на микробиологическом производстве: предотвращение фагового заражения извне; использование химических агентов, препятствующих размножению фага [4,6,7]. Однако наиболее распространенным методом

борьбы с фаголизисом в настоящее время является получение штаммов-продуцентов, устойчивых к бактериофагам.

Нами получена и изучена коллекция фагорезистентных (ФР) мутантов, не уступающих по лизиссинтезирующей активности родительскому штамму - продуценту *B. lactofermentum* НИТИА-88.

Материал и методика. Использовали бактериальный штамм - продуцент лизина НИТИА-88 [2], бактериофаги *B. lactofermentum* ВЛА 1, ВЛА 2, ВЛА 3 (настоящая работа).

Среды. Мясо-петушиный бульон (МПБ), мясо-петушиный агар (МПА), пептон-агар -1,2% и 0,7%. Ферментационная среда следующего состава: меласса-12,5% (по РВ), сернистый гидротитат натрия-1,5% (по сухому весу натрия), мел-2%, рН среды-7,2-7,4.

Титрование фага, клонирование из отдельных негативных колоний для биологической очистки фага, получение фага в высоком титре проводили по методам, описанным Адамсом [1].

Лизиссинтезирующую активность определяли следующим образом: 1 мл суточной культуры вносили в 500 мл колбы Эрленмейера, содержащей 15 мл ферментационной среды, и инкубировали на качалках со скоростью вращения 220-240 об/мин, при температуре 30° в течение 72 часов. Количество лизина в культуральной жидкости (КЖ) определяли методом бумажной хроматографии.

Результаты и обсуждение. За время использования высокоактивного штамма - продуцента лизина *B. lactofermentum* НИТИА-88 на Чаренцаванском ОПЗ "Лизин" было выделено 3 фага (ВЛА 1, ВЛА 2, ВЛА 3), лизирующие культуру клеток.

Для получения ФР- мутантов смесь бактериальной и фаговой культур высевали на чашки с МПА.

Титр фаговых частиц в смеси составлял $1-5 \cdot 10^7$, в то время как титр бактериальной суспензии не превышал $1-5 \cdot 10^8$. Использование разбавленной бактериальной суспензии было обусловлено необычайно высокой частотой возникновения спонтанных ФР-мутантов. Так, частота возникновения спонтанных ФР-мутантов к фагам ВЛА 1, ВЛА 2, ВЛА 3 соответственно составляла $4 \cdot 10^{-5}$, $2 \cdot 10^{-4}$ и $5 \cdot 10^{-4}$.

ФР-мутанты отбирали после двукратной проверки на устойчивость путем нанесения фага в титре примерно 10^6 ф.ч./мл на газон непьющей культуры. Мутанты, устойчивые ко всем трем выделенным фагам, отбирали позитивно. Схема получения этих мутантов приведена ниже.

На каждом из этапов отбора по 80-100 ФР-мутантов проверяли на продуктивность по лизину методом ферментации. При этом было обнаружено, что лишь 10-12% ФР-мутантов сохраняют активность родительского штамма, у остальных мутантов отмечается значительное снижение продуктивности по лизину. Возможно, это связано с тем, что

фагоустойчивость, появившаяся вследствие некой мутации, может быть обусловлена различными изменениями в клеточной стенке, что в свою очередь может нарушить транспорт конечного синтезируемого продукта.

На каждом из последующих этапов отбора в качестве исходной культуры использовали один из ФР-мутантов, отобранных на предыдущем этапе, не уступающий по продуктивности исходному штамму. Таким образом, было отселекционировано 8 ФР-мутантов *B. lactofermentum* НИТИА-88, устойчивых ко всем трем выделенным



Схема селекции фагорезистентных мутантов *B. lactofermentum* НИТИА-88

фагам и синтезирующих лизин на уровне родительского штамма.

Далее была исследована способность этих мутантов расти и продуцировать лизин как в присутствии лизатов отдельных фагов, так и их комбинаций. При проведении ферментации в козбы одновременно с посевным материалом вносили лизат фага в титре не менее 10^8 . В конце ферментации нефелометрически определяли оптическую плотность (ОП) КЖ, выход лизина и титр фагов (табл. 1 и 2).

Из таблиц видно, что при одновременном культивировании мутанта N 1 с фагами титр последних заметно снижается, что свидетельствует о неадсорбционной природе фагорезистентности мутанта. При проверке мутанта N 3 существенного снижения титра фага не обнаруживается. Как показали результаты исследований, у 3 из 8 проверенных ФР-

Таблица 1. Выход лизина, рост культуры и титр фага при ферментации штамма *V.lactofermentum* НИТИА-88 и ФР-мутантов в присутствии фагов ВЛА 1, ВЛА 2 и ВЛА 3.

Начальный титр фагов в ферментационной среде	Штаммы								
	<i>V.lactofermentum</i> НИТИА-88			ФР-мутант N1			ФР-мутант N3		
	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага
Без фага	60	0.7	-	60	0.72	-	59	0.71	-
ВЛА 1 ($4 \cdot 10^5$)	0,5	0.22	$3 \cdot 10^{10}$	58	0.71	10^5	61	0.73	$7 \cdot 10^5$
ВЛА 2 ($3 \cdot 10^5$)	0,5	0.23	$1 \cdot 10^{10}$	60	0.74	10^5	58	0.7	$1 \cdot 10^5$
ВЛА 3 ($4 \cdot 10^5$)	0,5	0.31	$2 \cdot 10^{10}$	59	0.71	10^5	60	0.73	$1 \cdot 10^5$

мутантов фагорезистентность имеет неадсорбционную природу, в

Таблица 2. Выход лизина, рост культуры и титр фага при ферментации штамма *V.lactofermentum* и ФР-мутантов в присутствии комбинации фагов.

Начальный титр фагов в ферментационной среде	Штаммы								
	<i>V.lactofermentum</i> НИТИА-88			ФР-мутант N1			ФР-мутант N3		
	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага	лизин, г/л	ОП КЖ	титр фага
Без фага	58	0.72	-	61	0.74	-	59	0.7	-
Комбинация фагов ВЛА 1, ВЛА 3 (по $3 \cdot 10^5$)	0,5	0,24	$3 \cdot 10^{10}$	60	0.71	10^5	61	0.72	$1 \cdot 10^5$
Комбинация фагов ВЛА 1, ВЛА 2 и ВЛА 3 (по $3 \cdot 10^5$)	0,5	0,21	$2 \cdot 10^{10}$	60	0.73	10^5	61	0.73	$1 \cdot 10^5$

оставшихся 5 случаях устойчивость к фагам - следствие нарушения адсорбции.

Одним из основных путей интенсификации процесса производства лизина является переход от периодического способа производства лизина к непрерывному. В случае адсорбционного механизма устойчивости штаммов к фагам фаговые частицы, попадающие в аппарат, не адсорбируются на поверхности бактериальной клетки, а сохраняются в

аппаратах в виде дискретных, потенциально активных фаговых частиц. Поскольку при непрерывных процессах биосинтеза происходит накопление в среде различных мутантов культивируемого штамма-продуцента, в том числе и фагочувствительных мутантов, сохраняющиеся в аппаратах фаговые частицы, начиная размножаться за счет фагочувствительных клеток, могут привести к лизису культуры, а тем самым - к снижению выхода целевого продукта и вынужденной остановке непрерывного процесса. При использовании же фагоустойчивого штамма с неадсорбционным механизмом устойчивости попадающие в аппарат в процессе культивирования штамма фаговые частицы будут необратимо адсорбироваться и нейтрализовываться клетками культуры продуцента. Такой тип устойчивости к фагам может быть связан с нарушением любого из этапов внутриклеточного развития фагов. Одной из причин, вызывающих подобного рода нарушения, могут быть мутации, препятствующие образованию метаболитов, необходимых для развития фага.

Изложенные результаты позволяют заключить, что полученные высокоактивные продуценты лизина с неадсорбционной природой устойчивости будут иметь приоритетную значимость при непрерывном способе производства лизина, так как использование их повысит степень зашпиженности процесса ферментации от фаголизиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адимс М. Бактериофаги. М., 507, 1961.
2. Оганезова Г.Г., Чичлян М.Б., Агабекян Э.Л., Якимович Н.Н., Сакиян В.А., Восенко А.М., Карабекян Б.П., Бабасян Н.С., Кажоян С.В., Чахмахчян А.Г. - А.с. N 1678053, 1991.
3. Ogata S. *Biotechnol. and Bioeng.*, 22, 177, 1980.
4. Ogata S., Uneda A., Hongo M. *Gen. Appl. Microbiol.*, 20, 168, 1974.
5. Oki T., Matsui T. *Gen. Appl. Microbiol.*, 9, 205, 1968.
6. Murata A., Katagawa K. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2159, 1973.
7. Murata A., Katagawa K. *Agric. Biol. Chem.*, 37, 1145, 1973.

Получено 1 III 1996