



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 579.253.43

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТ-КУЛЬТУР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕШЯН, Ж.В. КАРАПЕТЯН,
А.Г. ДАВТЯН, А.О. КОЛОЯН, Г.Е. АВЕТИСОВА

ЗАО “НИИ Биотехнологии” МТЭР РА, Ереван

Методом химического мутагенеза получены ауксотрофные по пролину, гистидину, изолейцину, валину и аргинину мутанты штаммов дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Отобраны тест-культуры для сравнительной оценки штаммов-продуцентов по активности синтеза аминокислот микробиологическим способом.

Отработаны условия совместного культивирования штаммов-продуцентов и тест-культур. Показана целесообразность использования полученных тест-культур для эффективности селекции, направленной на повышение активности штаммов-продуцентов аминокислот.

Brevibacterium flavum ATCC 14067 и *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 վայրի տիպի շտամների մոտ քիմիական մուտագենների ճանապարհով ստացվել են ըստ պրոլինի, հիստիդինի, իզոլեյցինի, վալինի և արգինինի աուքսոտրոֆ մուտանտներ, որոնցից ընտրվել են թեստ-կուլտուրաներ մանրէաբանական եղանակով ամինաթթուների շտամ-արտադրիչների ակտիվ-վուրջյան համեմատական գնահատման համար:

Մշակվել են շտամ-արտադրիչների և թեստ-կուլտուրաների համատեղ կուլտիվացման պայմանները: Ցույց է տրվել ամինաթթուների բարձր ակտիվ-վուրջյամբ շտամ-արտադրիչների էֆեկտիվ սելեկցիայի համար թեստ-կուլտուրաների օգտագործման նպատակահարմարությունը:

Auxotroph mutants of wild type *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, which require proline, histidine, isoleucine, valine or arginine have been isolated by chemical mutagenesis. The test-cultures for microbiological testing of amino-acid strain-producers activity were selected.

The joint cultivation conditions of strain-producers and test-cultures have been developed. Test-cultures were demonstrated to be expedient for effective selection aimed to increase the activity of amino acid strain-producers.

Штамм-продуцент - аминокислоты - тест-культуры

Производство аминокислот играет очень важную роль в мировой индустрии из-за огромного спроса на них [6, 12]. В ближайшие годы ожидается дальнейший рост уровня их потребления [3, 5-7, 10], поэтому разработка новых производственных процессов, способных удовлетворить

спрос на нужные аминокислоты, является актуальной. Непрерывающиеся в этом направлении усилия разных исследовательских групп направлены прежде всего на решение задачи интенсификации микробиологических технологий производства аминокислот, что в первую очередь означает конструирование высокоактивных штаммов-продуцентов с улучшенными технологическими показателями [2, 4, 8, 9, 11].

Получение и усовершенствование штаммов-продуцентов аминокислот неизбежно требуют проверки большого количества мутантов. Как правило, эффективность селекции тем больше, чем больше объем материала, подвергаемого отбору. Между тем при “ручном отборе”, когда выделяются отдельные колонии и проверяются в колбочной ферментации на качалках, вероятность нахождения высокоактивных штаммов лимитируется количеством изучаемого материала.

С этой точки зрения трудно переоценить значение для селекции микробиологического метода предварительной оценки активности штаммов-продуцентов аминокислот, позволяющего исключить заведомо неперспективные мутанты и, следовательно, сократить количество вариантов, подлежащих окончательной проверке.

Основная идея этого метода связана с явлением синтрофизма, когда при совместном высеве на минимальную среду вокруг колоний продуцентов образуются зоны роста микробов, нуждающихся в соответствующих аминокислотах. Величина зон находится в прямой зависимости от количества выделяемой аминокислоты. Колонии, образующие наибольшие зоны, используются для дальнейшей проверки при помощи более трудоемких и вместе с тем более точных способов оценки – ферментацией в колбах и ферментерах.

Для применения указанного метода в селекции штаммов-продуцентов аминокислот необходимым условием является наличие соответствующих тест-культур, ауксотрофных по интересующим аминокислотам.

В настоящей статье обобщены результаты работ по получению тест-культур, использованных нами для селекции высокоактивных штаммов-продуцентов пролина, гистидина, валина, аргинина и изолейцина.

Материал и методика. В работе использованы бактериальные штаммы: *B. flavum* ATCC 14067 и *S. glutamicum* ATCC 13032.

Для выращивания культур в полноценных условиях использовали мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА). В качестве минимальной среды использовали среду Гловера с добавками следующего состава, %: глюкоза - 0,8; NH_4Cl - 0,5; NH_4NO_3 - 0,1; Na_2SO_4 - 0,2; K_2HPO_4 - 0,3; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; биотин-100 мкг/мл; тиамин-100 мкг/мл; pH - 7,0-7,5.

Мутагенизацию культур 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (НГ) и отбор ауксотрофных мутантов снятием реплик проводили по известным методикам [1] с некоторыми модификациями.

Для определения гистидинсинтезирующей активности отобранных с помощью his^+ тест-культуры штаммов-продуцентов в условиях колбочной ферментации использовали полусинтетическую среду следующего состава, %: сахар - 13,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,0; дрожжевой экстракт - 1,5; мочевины - 0,2;

MgSO₄ · 7H₂O - 0,1; KH₂PO₄ - 0,15; K₂HPO₄ - 0,05; Na₂HPO₄ - 0,05; MgSO₄ - 0,1; CaCO₃ - 4,0; pH - 7,6-7,8. Ферментационную среду (14 мл) заливали в колбы Эрленмейера емкостью 500 мл и добавляли 1мл посевного материала, выращенного в МПБ с аэрацией в течение 24 ч. Культуры инкубировали на круговой качалке (220 об/мин) при 30⁰ в течение 70-72 ч. Концентрацию гистидина в культуральной жидкости определяли методом тонкослойной хроматографии в системе аммиак-бутанол-этанол-ацетон-вода (2,5:2:2:4:1) или на аминокислотном анализаторе ААА Т339 (Чехия). Полученные результаты обрабатывали статистически, достоверность различий определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В качестве исходных культур для получения ауксотрофных мутантов использовали штаммы дикого типа *Br. flavum* 14067 и *C. glutamicum* 13032. Выбор этих штаммов связан с тем, что они не содержат мутаций ауксотрофности по каким-либо аминокислотам. В противном случае при микробиологическом тестировании добавление в минимальную среду дополнительных аминокислот, необходимых для удовлетворения ростовых потребностей тест-культуры, может оказать нежелательное влияние на процесс биосинтеза целевой аминокислоты и исказить картину “кормежки” на чашке. Кроме того, и исходные штаммы, и исследуемые штаммы-продуценты аминокислот относятся к группе коринеформных бактерий и одинаково хорошо растут на одних и тех же минимальных средах и температурах, что особенно важно для их совместного культивирования.

Ауксотрофные по аминокислотам мутанты были получены под действием НГ. Обработку клеток в логарифмической фазе роста проводили в растворе ацетатного буфера (pH 5,6) с концентрацией мутагена 300 мкг/мл в течение 30 мин. После мутагенизации отмытые от мутагена культуры подращивали в МПБ для избавления от мутационных гетерозигот и фенотипического проявления индуцированных мутаций. Затем клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в минимальной среде. После непродолжительного инкубирования с целью активации прототрофных клеток и “истощения” ауксотрофных мутантов культуры в течение 4 ч обрабатывали пенициллином (1000 мкг/мл), который, убивая делящиеся прототрофные клетки, обогащает популяцию ауксотрофными мутантами. Для отбора ауксотрофных мутантов культуры из соответствующих разведений высевали на чашки с минимальным агаром, содержащим интересующую нас аминокислоту, и инкубировали при 30⁰ для получения отдельных колоний. Через 3-5 сут суспензии выросших колоний с помощью репликатора наносили на минимальную среду без и с добавлением целевой аминокислоты и инкубировали 2-3 сут. Мутанты, отобранные по отсутствию роста на среде без добавки, пересеивали на МПБ истощением штрихов до отдельных колоний, которые повторно проверяли на ауксотрофность.

Результаты опытов по мутагенизации культур и отбору ауксотрофных мутантов приведены в табл.1.

Таблица 1. Получение ауксотрофных по аминокислотам мутантов под действием нитрозогуанидина

Ауксотрофность	Исходный штамм	Титр, кл./мл		Выживаемость, %	Количество проверенных клеток $\times 10^3$	Количество мутантов
		до НГ $\times 10^8$	после НГ $\times 10^8$			
pro ⁻	<i>Br. flavum</i> 14067	3.6	1.6	44.4	1.0	8
his ⁻	“ – “	4.0	2.2	55.0	0.98	10
val ⁻ ,ile ⁻	“ – “	3.4	2.1	61.8	4.3	2
arg ⁻	<i>C. glutamicum</i> 13032	2.8	1.8	64.3	0.93	14
ile ⁻	“ – “	3.8	2.1	55.2	5.7	3

Из табл. 1 видно, что в разных экспериментах было выделено всего 37 ауксотрофов, в том числе: pro⁻ - 8, his⁻ - 10, val⁻,ile⁻ - 2, arg⁻ - 14, ile⁻ - 3.

Основным требованием, предъявляемым к тест-культурам, является низкая частота реверсии к исходному генотипу, т.е. к прототрофности. Поэтому для окончательного отбора тест-культур были проведены эксперименты для определения частоты возникновения спонтанных ревертантов у всех полученных ауксотрофных мутантов. С этой целью выращенные в течение ночи культуры ауксотрофов были сконцентрированы центрифугированием до титра 10^9 - 10^{11} кл./мл и высеяны на минимальную среду.

Таблица 2. Индексы спонтанных реверсий ауксотрофных мутантов

Мутант	№	Количество проверенных клеток	Количество ревертантов	Индекс реверсии*
pro ⁻	1	$6.2 \cdot 10^9$	0	$< 10^{-9**}$
his ⁻	1	$5.2 \cdot 10^{10}$	$3.5 \cdot 10^8$	$6.7 \cdot 10^9$
	2	$2.2 \cdot 10^{10}$	0	$< 10^{-10**}$
	3	$4.3 \cdot 10^{10}$	$5.7 \cdot 10^8$	$1.3 \cdot 10^{-6}$
val ⁻ ,ile ⁻	1	$1.1 \cdot 10^{11}$	0	$< 10^{-11**}$
arg ⁻	1	$9.2 \cdot 10^9$	0	$< 10^{-9**}$
	2	$1.2 \cdot 10^{10}$	$2.8 \cdot 10^1$	$2.3 \cdot 10^{-9}$
ile ⁻	1	$1.1 \cdot 10^{10}$	0	$< 10^{-10**}$
	2	$4.1 \cdot 10^9$	$2.2 \cdot 10^2$	$5.4 \cdot 10^{-8}$

* В табл.1 не приведены значения индексов реверсий мутантов, не отличающихся существенно от представленных.

** Отобранные тест-культуры

После инкубирования в течение 5-7 сут и подсчета количества выросших на чашках ревертантов были определены индексы реверсий по маркерам ауксотрофности. Результаты показали, что ауксотрофные мутанты отличаются по свойству реверсии к исходному генотипу (табл. 2). В качестве тест-культур были выбраны отличающиеся низкой частотой реверсии мутанты.

Эксперименты по определению активности синтеза аминокислот отобранными микробиологическим методом штаммами в условиях колбочной ферментации подтвердили эффективность селекции с использованием полученных нами тест-культур. Варианты, образующие маленькие зоны или совсем не образующие их, и при глубинной ферментации, как правило, выделяют в питательную среду очень мало целевой аминокислоты. Наиболее активные штаммы-продуценты отбирали среди клонов, вокруг которых, независимо от способа посева, образуются сравнительно большие и густые зоны роста тест-культуры.

Таблица 3. Оценка гистидинсинтезирующей способности ауксотрофных мутантов *Br. flavum* LGS2 микробиологическим методом и в условиях колбочной ферментации

Штамм		Гистидин	
		микробиологический метод *	колбочная ферментация, г/л
<i>Br. flavum</i> LGS2 (исходный)	№ мутанта	++	11.3± 0.7
<i>Br. flavum</i> LGS2 ауксотрофы по треонину	1	–	2,2± 0.24
	2	+	5,2± 0.47
	3	+	7,4± 0.6
	4	+++	13,5± 0.8**
	5	+++	14,2± 0.87**
<i>Br. flavum</i> LGS2 ауксотрофы по триптофану	6	++	10,8± 0.8
	1	+	3,1± 0.2
	2	+	8,2± 1.2
	3	+++	15,3± 1.1**
	4	+++	14,2± 0.9**
5	++	12,2± 0.7	
6	++	11,5± 0.6	

* - оценка активности синтеза гистидина по размерам и густоте зоны роста тест-культуры в сравнении с контрольным штаммом *Br. flavum* LGS2 (++)

** - достоверное повышение по сравнению с исходным штаммом

Примером успешной селекции с использованием тест-культуры может служить отбор продуцентов с повышенной активностью из ауксотрофных мутантов, полученных нами у штамма-продуцента гистидина *Br. flavum* LGS2. Усредненные результаты 10-15-колбочных ферментаций ауксотрофными мутантами LGS2 в сравнении с результатами микробиологического определения приведены в табл.3.

На основании сравнительного анализа данных, представленных в табл. 3, для дальнейшей селекции были отобраны ауксотроф по треонину № 5 и ауксотроф по триптофану № 3, гистидинсинтезирующая активность которых достоверно превышает активность исходного штамма.

Описанные тест-культуры успешно используются в рамках проводимых в НИИ биотехнологии работ по получению высокоактивных штаммов-продуцентов соответствующих аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. Под ред. С.И. Алиханяна, «Мир», М., 1976.
2. *Blombach B., Schreiner M. E., Moch M., Oldiges M., Eikmanns B. J.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Mar 2:17333167, 2007.
3. *Brown K.* Business Communication Company, Mini-Review, <http://www.bccresearch.com/food/b132r.html>, 2005.
4. *Demain A.L.* *Tibtech*, 18, 26-31, 2000.
5. *Eggeling H., Sahm L.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 146-153, 1999.
6. *Hermann, T. J.* *Biotechnol.* 104, 155-172, 2003.
7. *Ikeda M.* Microbial production of L-amino acids. New York, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Springer, 79, 1-35, 2003.
8. *Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Y. I.* US Patent 20050048631, 2005.
9. *Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Y. I.* US Patent 20050176033, 2005.
10. *Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:1-8, 2005.
11. *Tateno T., Fukuda H., Kondo A.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 6:1213-1220, 2007.
12. *Wendisch V.F., Marx A., Kelle R., Buchholz S.* Biorefineries, biobased industrial processes and products. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 201-216, 2006.

Поступила 21.04.2008